

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KARINA CZAIKOSKI

CINÉTICA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS
DE FLORES DE *EUPATORIUM INTERMEDIUM* OBTIDOS COM CO₂
SUPERCRÍTICO E PROPANO COMPRIMIDO

CURITIBA
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KARINA CZAIKOSKI

CINÉTICA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS
DE FLORES DE *EUPATORIUM INTERMEDIUM* OBTIDOS COM CO₂
SUPERCRÍTICO E PROPANO COMPRIMIDO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal
do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau
de Doutora em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Agnes de Paula Scheer

CURITIBA

2014

Czaikoski, Karina

Cinética, composição química e atividade biológica de extratos de flores de *Eupatorium intermedium* obtidos com CO₂ supercrítico e propano comprimido / Karina Czaikoski. – Curitiba, 2014.
106 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos

Orientador: Marcos Lúcio Corazza

Coorientadora: Agnes de Paula Scheer

Bibliografia: p. 92-106

1. *Eupatorium intermedium*. 2. Extração (Química). 3. Antioxidantes. I. Corazza, Marcos Lúcio. II. Scheer, Agnes de Paula. III. Título.

CDD 668.52

KARINA CZAİKOSKI

**CINÉTICA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA
DE EXTRATOS DE FLORES DE *Eupatorium intermedium*
OBTIDOS A PARTIR DE CO₂ SUPERCRÍTICO E PROPANO
COMPRIMIDO**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de
Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão
formada pelos professores:




Orientador: Prof. Dr. MARCOS LÚCIO CORAZZA
Setor de Tecnologia, UFPR



Prof. Dr. EDSON ANTÔNIO DA SILVA
Campus de Toledo, UNIOESTE



Prof.ª Dr.ª MICHELE CRISTIANE MESOMO
Campus CEDETEG, UNICENTRO



Prof. Dr. FERNANDO AUGUSTO PEDERSEN VOLL
Setor de Tecnologia, UFPR



Prof. Dr. ÉVERTON FERNANDO ZANOELO
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 26 de novembro de 2014.

*Dedico este trabalho ao meu esposo Luiz Antonio,
aos meus pais Paulo e Marilene e minhas irmãs Paula
e Aline, pelo amor, carinho, dedicação, incentivo e
alegrias proporcionadas. Sem todos vocês nada disto
faria sentido.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, pela capacidade de cumprir cada etapa deste trabalho e por nunca soltar minha mão.

Ao Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza pela orientação, compreensão e pelos ensinamentos que contribuíram para a minha formação profissional, crescimento científico e intelectual.

À Profa. Dra. Agnes de Paula Scheer pela sua co-orientação que contribuiu imensamente para a realização deste trabalho.

À Dra. Carmen Lúcia Queiroga, do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) – UNICAMP, pelo suporte importantíssimo nas análises cromatográficas.

À Profa. Dra. Michele Cristiane Mesomo, do departamento de Engenharia de Alimentos da UNICENTRO, pela imensa colaboração, amizade e por ter possibilitado a realização de parte do trabalho no Extrat – UNICENTRO.

À minha querida amiga Paloma Souza Cabral, pela amizade imensurável, bom-humor, companhia e incentivo. Sei que tudo foi de coração.

Aos meus amigos Jacqueline Satiko e Diogo Mussoi, obrigada pela amizade sem limites, pelos valiosos conselhos, apoio emocional e psicológico.

À Profa. Dra. Katielle Rosalva Voncik Córdova pela amizade, estímulo e conselhos.

Aos professores membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite para contribuir valiosamente com o trabalho.

Aos meus sogros, Zico e Vera, pelo companheirismo, afeto e momentos de alegria.

Aos professores do Programa de Doutorado em Engenharia de Alimentos, pelo aprendizado.

Ao Prof. Dr. Cícero Deschamps e Dr. Wanderlei do Amaral pelo apoio na obtenção da matéria prima e nas hidrodestilações.

Ao Prof. Dr. Osmar Roberto Dalla Santa, pela contribuição na análise de atividade antimicrobiana.

Aos funcionários dos laboratórios da UFPR. Um agradecimento especial, ao secretário da Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Paulo Roberto

Krainski, por sua pronta resposta, profissionalismo e competência com que sempre me atendeu.

A todas as pessoas que contribuíram de forma indireta para a realização desse trabalho, seja pela amizade, momentos de descontração ou orações.

À UFPR e UNICENTRO, pela possibilidade de usufruir de sua estrutura durante o doutorado, em especial o LACTA, laboratório onde parte deste trabalho foi realizada.

Ao PPGEAL, pela oportunidade.

À CAPES pelo apoio financeiro.

*A maioria das pessoas espera oportunidades,
mas só vencem aquelas que se dedicam a
explorar possibilidades. Enquanto os primeiros
esperam sentados o convite da ocasião para
sentarem no banquete da vida, os segundos,
os que vencem, deixam as comodidades, o
conforto e saem à procura do progresso, do
melhoramento, desafiando as contingências.*

(Alberto Montalvão)

RESUMO

A obtenção de extratos de flores *Eupatorium intermedium* foi avaliada usando CO₂ supercrítico e propano comprimido. Foram avaliados os efeitos das condições de extração sobre a composição química, atividade antioxidante e antibacteriana, os quais foram comparados ao óleo essencial obtidos por hidrodestilação. Os experimentos de extração supercrítica e com fluido pressurizado foram realizados utilizando dois delineamentos fatorial 2², um para cada solvente, nos quais foi investigado o efeito das variáveis pressão e temperatura sob o rendimento de extrato. Os níveis de variação aplicados nas extrações com CO₂ supercrítico foram de 150, 200 e 250 bar e 30, 55 e 80 °C, alcançando um rendimento máximo de 5,85 %, na extração a 250 bar e 80 °C. Para a extração utilizando propano comprimido como solvente os níveis de variação foram de 30, 65 e 100 bar e 20, 40 e 60 °C, alcançando um rendimento máximo de 9,34 %, na extração a 100 bar e 60 °C. A hidrodestilação atingiu um rendimento máximo de 1,01 % de óleo essencial. Quando CO₂ supercrítico foi utilizado como solvente somente a pressão apresentou efeito significativo e positivo sobre o rendimento de extrato. Já para o propano comprimido somente a temperatura apresentou efeito significativo e positivo. A análise de cromatografia gasosa mostrou que os compostos majoritários dos extratos foram espatulenol, óxido de cariofileno, cariofileno (E), germacreno D, biciclogermacreno e carotol, para ambos solventes. Com relação ao óleo essencial, os compostos mais abundantes foram α-pineno, sabineno, β-pineno, limoneno, cariofileno (E), germacreno D, espatulenol e óxido de cariofileno. O maior valor de atividade antioxidante, determinado pelo método DPPH, foi encontrado para o extrato obtido usando CO₂ como solvente a 30 °C e 150 bar (36,55 % a 3500 µg/mL), enquanto o óleo essencial, obtido por hidrodestilação, apresentou a maior atividade antioxidante pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio (1154,69 mg α-tocoferol/g_{ext}). O extrato obtido usando propano comprimido a 20 °C e 100 bar apresentou o maior conteúdo de fenólicos totais (10,03 mg GAE/g_{ext}). A maior atividade antibacteriana foi observada para os extratos obtidos utilizando CO₂ supercrítico contra *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

Palavras chave: Extratos vegetais. Extração supercrítica. Antioxidante. Antibacteriano.

ABSTRACT

The extraction of *Eupatorium intermedium* flowers was evaluated using supercritical CO₂ and compressed propane. The effects of the extraction conditions on the chemical composition, antioxidant and antibacterial activity were evaluated and compared with the essential oil obtained by hydrodistillation technique. Supercritical extraction and pressurized fluid experiments were carried out using two factorial designs 2², one for each solvent, in which it was investigated the effect of varying pressure and temperature on the yield of extract. The variation levels applied to the supercritical CO₂ extraction were 150 at 250 bar and 30 to 80 °C, in which the maximum yield of extraction was 5.85 wt% at 250 and 80 °C. For extraction using compressed propane as solvent the variation levels were 30 to 100 bar and 20 to 60 °C, in which the maximum yield of extraction was 9.34 wt% at 100 bar and 60 °C. The hydrodistillation achieved a maximum yield of 1.01 wt% of essential oil. When supercritical CO₂ was used just the pressure presented a positive and significant effect on the extraction yield. For compressed propane just the temperature presented positive and significant effect. Gas chromatographic analysis showed that the major compounds of the extracts were spathulenol, caryophyllene oxide, caryophyllene (E), germacrene D, bicyclogermacrene and carotol, for both solvents. Regarding the essential oil, the most abundant substances were α-pinene, sabinene, β-pinene, limonene, caryophyllene (E), germacrene D, spathulenol and caryophyllene oxide. The highest values of antioxidant activities determined by the DPPH method was found for the extract obtained using CO₂ as solvent at 303.15 K and 15 MPa (36,55 % at 3500 µg/mL), while the essential oil, obtained by hydrodistillation, presented the highest antioxidant activity by the phosphomolybdenum reducing method (1154,69 mg α-tocophrol/g_{ext}). The extract obtained using compressed propane at 293.15 K and 3 MPa presented the highest phenolic content (10,03 mg GAE/g_{ext}). The highest antibacterial activity was observed for the extracts obtained with supercritical CO₂ against *S. aureus* and *L. monocytogenes*.

Keyword: Vegetable extracts. Supercritical extraction. Antioxidant. Antibacterial.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – <i>Eupatorium intermedium</i> DC.....	22
FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ISOPRENO	26
FIGURA 3 – DIAGRAMA GENÉRICO DE FASES DE UMA SUBSTÂNCIA PURA ..	39
FIGURA 4 – CURVA TÍPICA DE EXTRAÇÃO COM REPRESENTAÇÃO DAS TRÊS ETAPAS DO PROCESSO.	41
FIGURA 5 – FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS E ANÁLISES ADOTADAS PARA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E ÓLEO ESSENCIAL E ANÁLISES REALIZADAS	46
FIGURA 6 – DIAGRAMA DO APARATO EXPERIMENTAL MONTADO EM ESCALA DE LABORATÓRIO PARA A OBTENÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS UTILIZANDO FLUIDO PRESSURIZADO COMO SOLVENTE	53
FIGURA 7 – CURVAS CINÉTICAS EXPERIMENTAIS PARA O PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE <i>E. intermedium</i> USANDO CO ₂ SUPERCRÍTICO COMO SOLVENTE.....	69
FIGURA 8 – CURVAS CINÉTICAS EXPERIMENTAIS PARA O PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE <i>E. intermedium</i> USANDO PROPANO COMPRIMIDO COMO SOLVENTE..	70
FIGURA 9 – CROMATOGRAMA DOS EXTRATOS DE FLORES <i>E. intermedium</i> OBTIDOS COM (A) CO ₂ SUPERCRÍTICO A 150 BAR E 30 °C E (B) PROPANO COMPRIMIDO A 30 BAR E 20 °C.	75
FIGURA 10 – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. intermedium</i> OBTIDO POR HIDRODESTILAÇÃO.....	76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PROPRIEDADES CRÍTICAS DE ALGUNS SOLVENTES QUE PODEM SER UTILIZADOS NA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA.....	43
TABELA 2 – MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^2 , COM VARIÁVEIS INDEPENDENTES (PRESSÃO E TEMPERATURA) PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE <i>Eupatorium intermedium</i> , VIA EXTRAÇÃO COM CO ₂ SUPERCRÍTICO.....	54
TABELA 3 – MATRIZ DO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL 2^2 , COM VARIÁVEIS INDEPENDENTES (PRESSÃO E TEMPERATURA) PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE <i>Eupatorium intermedium</i> , VIA EXTRAÇÃO COM PROPANO COMPRIMIDO	55
TABELA 4 – CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E RENDIMENTOS OBTIDOS NOS EXTRATOS DE <i>Eupatorium intermedium</i> USANDO CO ₂ NO ESTADO SUPERCRÍTICO COMO SOLVENTE	62
TABELA 5 – EFEITO DAS VARIÁVEIS PRESSÃO E TEMPERATURA SOBRE A RESPOSTA Y ₁ (RENDIMENTO DE EXTRATO EM %)	63
TABELA 6 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA PREDIÇÃO DO RENDIMENTO DE EXTRATO DE <i>Eupatorium intermedium</i> UTILIZANDO CO ₂ SUPERCRÍTICO COMO SOLVENTE	63
TABELA 7 – CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E RENDIMENTOS OBTIDOS NOS EXTRATOS DE <i>Eupatorium intermedium</i> USANDO PROPANO COMPRIMIDO COMO SOLVENTE	66
TABELA 8 – EFEITO DAS VARIÁVEIS SOBRE A RESPOSTA Y ₂ (RENDIMENTO DE EXTRATO EM %).....	66
TABELA 9 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA PREDIÇÃO DO RENDIMENTO DE EXTRATO DE <i>Eupatorium intermedium</i> UTILIZANDO PROPANO COMPRIMIDO COMO SOLVENTE	67
TABELA 10 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO VOLÁTIL DOS EXTRATOS DE FLORES DE <i>Eupatorium intermedium</i> OBTIDOS UTILIZANDOS CO ₂ E PROPANO COMO SOLVENTES E DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDOS POR HIDRODESTILAÇÃO	72

TABELA 11 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE <i>E. intermedium</i> OBTIDOS USANDO CO ₂ SUPERCRÍTICO E PROPANO COMPRIMIDO COMO SOLVENTE E DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO POR HIDRODESTILAÇÃO	80
TABELA 12 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATOS DE <i>Eupatorium intermedium</i> , OBTIDOS UTILIZANDO CO ₂ SUPERCRÍTICO E PROPANO COMPRIMIDO COMO SOLVENTE ...	84

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA – atividade antioxidante

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC *Association of Official Analytical Chemists*

AOCS *American Oil Chemists' Society*

BHA – hidroxianosil bitilato

BHT – hidroxitolueno butilato CER - *Constant extraction rate period*

CER – *constant extraction rate*

CG/EM – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CIM – concentração mínima inibitória

CO₂ – dióxido de carbono

CPQBA – Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas

DPPH – 2,2-diphenil1-picrilhidrazil

DMSO - dimetilsulfóxido

d_s – diâmetro médio superficial das partículas da matriz vegetal em cm

e – resíduo (erro experimental)

EC₅₀ – concentração eficiente

FER - *Falling extraction rate period*

FT – fenólicos totais

GAE – equivalente de ácido gálico

GRAS – geralmente reconhecido como seguro

HFIE – Herbário das Faculdades Integradas Espírita

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IR – índice de retenção

ISO – *International Standard Organization*

L - comprimento

LACTA – Laboratório de Cinética e Termodinâmica Aplicada

LQAA – Laboratório de Química Analítica Aplicada

MBM - Herbário do Museu Botânico Municipal

P_c – pressão crítico

PC – ponto crítico

PT – ponto triplo

TBHQ – di- τ -butil-hidroquinona

TSA – ágar tripticase de soja

TSB – caldo tripticase de soja

T_c – temperatura crítica

t_{cer} – Duração da etapa de taxa constante de extração - CER

t_{fer} – Duração da etapa de taxa decrescente de extração-FER

U – umidade em porcentagem

X_0 - rendimento global da extração

X – variável real

x – variável codificada

Y_1 – rendimento de extrato em %

Y – resposta do modelo matemático

ε – porosidade

β - coeficientes estimados na superfície de resposta

ρ_a – densidade aparente da matriz vegetal

ρ_{H_2O} – densidade da água

ϕ - diâmetro interno

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1 <i>Eupatorium intermedium</i> DC	21
3.2 ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS NATURAIS	24
3.2.1 Principais componentes dos óleos essenciais e extratos naturais	26
3.2.2 Aplicações dos óleos essenciais e extratos naturais	27
3.3 ANTIOXIDANTES	28
3.3.1 Métodos de avaliação da atividade antioxidante	30
3.4 ANTIMICROBIANOS	32
3.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	34
3.5.1 Extração com solvente orgânico	35
3.5.2 Extração por destilação por vapor d'água	36
3.5.3 Extração por fluido supercrítico	37
3.6 CONSIDERAÇÕES GERAIS	44
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 MATÉRIA PRIMA E COLHEITA	47
4.2 IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE	47
4.3 PREPARO DA MATÉRIA PRIMA	47
4.4 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA	48
4.4.1 Teor de umidade	48
4.4.2 Diâmetro médio da partícula	49
4.4.3 Densidade real e aparente	50

4.4.4 Porosidade do leito de partículas.....	50
4.5 Extração com solvente orgânico	51
4.6 Hidrodestilação	51
4.7 Extração supercrítica e com fluido pressurizado.....	52
4.7.1 Delineamento experimental para estudo do efeito da temperatura e pressão no rendimento de extrato das flores de <i>Eupatorium intermedium</i> DC via extração com CO ₂ supercrítico	54
4.7.2 Delineamento experimental para estudo do efeito da temperatura e pressão no rendimento de extrato das flores de <i>Eupatorium intermedium</i> via extração com propano comprimido.....	55
4.7.3 Avaliação dos modelos delineados.....	56
4.7.4 Curvas de extração.....	56
4.7.5 Determinação da solubilidade dos extratos	56
4.8 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS	57
4.8.1 Composição química	57
4.8.2 Avaliação da atividade antioxidante total	58
4.8.3 Avaliação da atividade antibacteriana.....	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	61
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO LEITO E DA MATRIZ VEGETAL.....	61
5.2 EFEITO DA PRESSÃO E TEMPERATURA NO RENDIMENTO DE EXTRATO DE <i>Eupatorium intermedium</i> UTILIZANDO CO ₂ SUPERCRÍTICO COMO SOLVENTE.....	61
5.3 EFEITO DA PRESSÃO E TEMPERATURA NO RENDIMENTO DE EXTRATO DE <i>Eupatorium intermedium</i> UTILIZANDO PROPANO COMPRIMIDO COMO SOLVENTE.....	65
5.4 CURVAS DE EXTRAÇÃO	68
5.5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS DE <i>Eupatorium intermedium</i>	71
5.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	79
5.6.1 Conteúdo de fenólicos totais.....	79

5.6.2 Método DPPH.....	81
5.6.3 Método de redução do complexo fosfomolibdênio.....	83
5.7 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	84
5.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
6 CONCLUSÕES	89
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	91
REFERÊNCIAS.....	92

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o país que detêm a maior biodiversidade do mundo, dentre a qual existem as plantas nativas que além de fonte de alimentos, podem ser utilizadas no desenvolvimento de diversos bioprodutos. Contudo, esse potencial permanece ainda subutilizado em razão de padrões culturais, que privilegiaram produtos e cultivos exóticos e não visualizam os benefícios que poderiam ser incorporados com a utilização de recursos naturais nativos, os quais muitas vezes são mais adaptados e passíveis de serem utilizados (CORANDIN; SIMINSKI; REIS, 2011). Além disso, o Brasil ainda exporta plantas medicinais para serem processadas no exterior para, na sequência, importar os produtos processados de maior valor agregado (MICHIELIN, 2009).

Dentre os inúmeros bioprodutos que podem ser obtidos a partir de plantas nativas temos os extratos naturais, que podem ser avaliados quanto ao seu potencial antioxidante e antimicrobiano, com a finalidade de aplicação em alimentos e medicamentos (BASER; BUCHBAUER, 2010). As tecnologias de extração para obtenção destes produtos apresentam um papel importante, pois a opção por um processo de extração pode levar a alterações na composição do extrato, o que muitas vezes acarreta em perda do potencial biológico. Além do que, a escolha deve ser baseada em um conjunto de fatores, entre eles rendimento, qualidade do produto, tempo de operação e custo (MESOMO, 2013).

Existem diversos métodos de extração na literatura. Um dos mais tradicionais é a extração por hidrodestilação, a qual apresenta baixos rendimentos e envolve altas temperaturas, que pode levar a degradação de compostos termolábeis. Outro método muito utilizado é a extração por solventes orgânicos, o qual também envolve altas temperaturas e ainda pode deixar resíduos do solvente no extrato, reduzindo a qualidade do produto, o que pode aumentar o custo do fracionamento ou diminuir o rendimento do composto de interesse (MARTINÉZ, 2005).

A extração com fluido supercrítico, ou em condições de pressão e temperatura próximas ao ponto crítico, é uma alternativa aos processos de extração convencionais. Nesse processo, a degradação térmica e a decomposição de compostos termolábeis são evitadas devido a operação ser realizada a baixas temperaturas e na ausência de luz e oxigênio, prevenindo assim reações de

oxidação (CORTESI *et al.* 1999; DÍAZ-REINOSO, *et al.* 2006; MARTÍNEZ, 2005). O dióxido de carbono é o solvente mais utilizado por apresentar temperatura e pressão crítica prontamente realizáveis na prática industrial, ser inerte, seguro, não tóxico, não carcinogênico, entre outras vantagens (ABAROUDI *et al.*, 1999). Uma alternativa ao CO₂ é o propano, que apesar de não apresentar todas as vantagens do CO₂, tem alto poder de solvatação e as pressões envolvidas na extração são menores às usadas no processo com CO₂ (SPARKS *et al.*, 2006).

As operações de extração com fluidos supercríticos, que geralmente envolvem o contato de uma fase sólida com um fluido supercrítico, requerem o conhecimento dos aspectos termodinâmicos (solubilidade e seletividade) e dos aspectos cinéticos (taxa de transferência de massa) do processo. Os aspectos termodinâmicos definem a máxima concentração de soluto obtida na fase supercrítica, como função das condições de operação (temperatura e pressão do solvente) e da composição da fase condensada, e os aspectos cinéticos representam a descrição e, eventualmente, a predição da taxa na qual o soluto é transferido da fase condensada para a fase supercrítica (DEBENEDETTI; REID, 1986).

A *Eupatorium intermedium* é uma planta nativa do Sul do Brasil e pertence a família Asteraceae, a qual apresenta grande riqueza de espécies com interesse terapêutico, muitas amplamente estudadas dos pontos de vista químico e farmacológico (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). Contudo, estudos acerca da obtenção de extratos de *E. intermedium*, e ainda, a avaliação desses quanto a composição química e atividade biológica são escassos. Souza (2007) avaliou a composição química e atividade antioxidante do extrato obtido via hidrodestilação.

Dessa forma, diante da importância do conhecimento e utilização de plantas nativas como matéria prima para obtenção de extratos naturais e com o intuito de identificar e contribuir para o entendimento dos fenômenos envolvidos no processo de extração torna-se interessante estudar o processo de obtenção de extratos de *E. intermedium*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo estudar o emprego do processo de extração supercrítica na obtenção de extratos de *E. intermedium*, buscando um extrato com potencial para aplicação como antioxidante e/ou antimicrobiano em alimentos, medicamentos ou na indústria química. Este estudo visa avaliar e comparar a composição química, atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos obtidos em diferentes condições de extração supercríticas, utilizando CO₂ supercrítico e propano comprimido como solventes, bem como do óleo essencial obtido por hidrodestilação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os rendimentos de extração por meio do emprego de diferentes métodos de extração: hidrodestilação, extração com CO₂ supercrítico, com propano comprimido e com solvente orgânico;
- Determinar as condições operacionais (temperatura e pressão) que maximizam o rendimento em extrato;
- Determinar as curvas cinéticas de extração supercrítica e com fluido pressurizado;
- Determinar e comparar o perfil químico do óleo essencial e dos extratos obtidos por diferentes métodos;
- Determinar a atividade antioxidante e conteúdo fenólico total do óleo essencial e dos extratos;
- Determinar a atividade antibacteriana do óleo essencial e dos diferentes extratos de *Eupatorium intermedium*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Este capítulo tem por finalidade reunir informações relevantes sobre a obtenção de extratos supercríticos e com fluidos pressurizados a partir de matrizes vegetais, produto de interesse deste trabalho, contemplando a relevância da utilização de plantas nativas, as características dos óleos essenciais e extratos, a importância e conceitualização de substâncias com ação antioxidante e antimicrobiana e a comparação entre diferentes técnicas de extração, bem como, informações detalhadas pertinentes ao processo de extração supercrítica.

3.1 *Eupatorium intermedium* DC

Recentemente a demanda por produtos de origem natural, desenvolvidos em bases sustentáveis, tem promovido projetos e empreendimentos para o desenvolvimento e o aproveitamento industrial de uma série de produtos com base em plantas nativas. Entre os produtos com maior potencialidade econômica, destacam-se as frutas nativas, os óleos vegetais, os óleos essenciais, os corantes naturais, os fitomedicamentos, as resinas e as fibras. Assim, inúmeras matérias-primas regionais nativas têm grande potencialidade de desenvolvimento de novos produtos, especialmente nos setores de cosméticos, da agroindústria, dos fármacos e dos alimentos (MIGUEL, 2009). Além disso, as plantas nativas constituem importante patrimônio cultural e econômico para as populações locais e o melhor conhecimento dessas plantas leva à apreciação e ao uso racional, que, por sua vez, reduzirá a crescente ameaça à biodiversidade (NASCIMENTO; OLIVEIRA, 2005).

Visto toda esta relevância e também o fato de que o potencial das plantas nativas brasileira tem sido reconhecido mais no exterior do que no próprio país (STUMPF; ROMANO; BARBIERI, 2008) é de grande importância o estudo de espécies que ainda não foram exploradas, a fim de melhor aproveitá-las e avaliar seu potencial para uma possível domesticação. No Brasil, grande parte da diversidade vegetal ainda não foi explorada e poderia, eventualmente, tornar-se uma

fonte valiosa de produtos químicos com utilização terapêutica ou industrial (SOUZA, 2007).

Eupatorium intermedium (FIGURA 1) é uma planta nativa, que segundo Brack e colaboradores (2009) é conhecida popularmente como vassoura e pertence à família Asteraceae. Esta família é representada por aproximadamente 1700 gêneros, os quais reúnem entre 24.000 a 30.000 espécies que se distribuem em todo o mundo (KATINAS *et al.*, 2007). No Brasil, segundo Sobral e colaboradores (2010), a família está representada por aproximadamente 294 gêneros e cerca de 2.085 espécies aceitos. A família Asteraceae pode ser considerada uma das mais importantes fontes de espécies vegetais de interesse terapêutico, dado o grande número de plantas desta família que são usadas popularmente como remédios, muitas das quais amplamente estudadas dos pontos de vista químico e farmacológico (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).



FIGURA 1 –*Eupatorium intermedium* DC
FONTE: ROLIM (2010); SCHNEIDER(2012).

O gênero *Eupatorium* foi descrito por Carl Linnaeus em 1753, que o denominou assim em homenagem ao rei Eupator, o primeiro a usar a planta como medicamento contra uma doença do fígado (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). *Eupatorium intermedium* é um arbusto ramoso de 1 a 1,5 m de altura, densamente folhoso até próximo às inflorescências, as quais são compostas de flores brancas. É uma planta nativa do Sul do Brasil, mas cresce desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul e Uruguai. Seu período de floração se estende de novembro a maio e, geralmente, é encontrada em campos sujos de coxilhas, encosta e topos de morros, em áreas com grande incidência de luminosidade solar (PALUCH; CASAGRANDE; MIELKE, 1999; SOUZA, 2007).

Segundo Di Stasi e Hiruma-Lima (2002) o gênero *Eupatorium* é amplamente utilizado na medicina popular e também muitas de suas espécies já foram avaliadas quanto a atividades biológicas. Souza (2007) testou a atividade antioxidante e anticolinesterásica do óleo essencial, obtido via hidrodestilação, de 33 espécies de *Eupatorium*, incluindo a espécie *E. intermedium*. Foi verificado que as inflorescências da espécie em questão apresentaram atividade antioxidante baixa, e atividade anticolinesterásica positiva, fato este de grande importância, pois mostra que esta planta apresenta potencial para o tratamento de Alzheimer, glaucoma ou ainda como anestésico (ALMEIDA, 1998).

Com relação a outras espécies do gênero *Eupatorium* foram encontrados diversas pesquisas. No estudo de Habtemariam e MacPherson (2000) foi avaliada a atividade antibacteriana de extratos etanólicos de *E. perfoliatum*, o qual se mostrou efetivo contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus megaterium*. Albuquerque e colaboradores (2004) testaram a efetividade do óleo essencial de *E. betonicaeforme*, obtido via hidrodestilação, no controle de larvas de *Aedes aegypti* e verificaram que este pode ser considerado como um agente larvicida natural. A atividade antioxidante, via captura de radicais DPPH, de *E. polystachyum* foi estudada por Souza e colaboradores (2007), os quais concluíram que o óleo essencial, obtido também por hidrodestilação, apresentou atividade positiva na inibição da oxidação. Melo (2012) verificou que o extrato hidroalcoólico de *E. ayapana* vent apresentou atividade ansiolítica, antidepressiva, anticonceptiva e antioxidante em ratos, e ainda foi evidenciado que o extrato não apresentou toxicidade. Em outro estudo foi comprovado a atividade antioxidante do extrato aquoso e etanólico de *E. lindleyanum* (YAN *et al.*, 2011). Ainda, Clavin e colaboradores (2000) verificaram que o extrato aquoso de *E. laevigatum*, *E. arnottianum* e *E. subhastatum* apresentaram atividade analgésica. Além disso, segundo Sharma e colaboradores (1998) várias espécies do gênero *Eupatorium* têm sido aplicadas como diuréticos, antiespasmódico, contra náuseas, diarreia, difteria, hepatoprotetor, anti-herpético, antitumoral, antileucêmico, estimulante cardíaco, hemostático, expectorante, emenagogo, antissifilítico, antimalático, anti-hemorragico e no tratamento de doenças de pele. E por fim, no Brasil, segundo Pio-Corrêa (1984), *E. bupleurifolium* foi descrita como melíferas, *E. oblongifolium* foi aconselhada nas moléstias broncopulmonares, o extrato de *E. ballotifolium* foi usado como aromático, emoliente e excitante, *E. triplinerve* foi indicado como tônico, estimulante, sudorífico,

estomáquico, digestivo, antidiarréico, antidisentérico, adstringente, e também para o combate do cólera, tétano e picadas de cobra e *E. laevigatum* foi usado no tratamento de feridas.

Dessa forma é evidente a importância do gênero *Eupatorium* e do conhecimento da composição química das plantas para a confirmação da presença dos princípios ativos e viabilização de sua aplicação, tanto em alimentos como medicamentos (CARDOSO *et al.*, 2008).

3.2 ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS NATURAIS

O conhecimento sobre óleos essenciais data desde alguns séculos antes da era cristã. As referências históricas de obtenção e utilização desses óleos estão ligadas, originalmente, aos países orientais, com destaque para o Egito, Pérsia, Japão, China e Índia (VITTI; BRITO, 2003). O interesse em tais produtos está relacionado as diversas propriedades biológicas que estes apresentam sobre seres humanos, animais e outras plantas, relacionadas a mistura de compostos presentes no óleo essencial (BASER; BUCHBAUER, 2010).

No Brasil, o decreto nº. 50.040, de 24 de janeiro de 1961 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) considera como óleo essencial o produto aromático, sávido, volátil, sob a forma oleosa e extraído de vegetais (BRASIL, 1961). Ou ainda, segundo a ANVISA, óleos essenciais são produtos voláteis de origem vegetal, obtidos por processos físicos, que podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados (BRASIL, 1999).

A International Standard Organization (ISO) define óleo essencial, no documento ISO 9235.2, como o produto obtido de partes de plantas por meio de destilação por arraste com vapor de água dos pericarpos de frutos cítricos (BASES; BUCHBAUER, 2012). Assim, produtos obtidos por outros métodos de extração, incluindo extração supercrítica e com fluido pressurizado não estão em conformidade com as normas descritas pela ISO e não podem ser chamados de óleo essencial, sendo comumente conhecidos como extratos (BASES; BUCHBAUER, 2012). Além do óleo essencial, a oleoresina também pode estar presente em um extrato. Nas oleoresinas podem estar presentes ácidos graxos,

metil ésteres de ácido graxos, pigmentos, cumarinas, psoralenos, esteróis e flavonas (REVERCHON, 1997). Em geral, são extraídas com solventes orgânicos, a partir de material vegetal fresco ou seco. Elas são praticamente sólidas à temperatura ambiente após a remoção do solvente (REVERCHON, 1997).

Muitos autores consideram os componentes voláteis equivalentes à alma da planta, pois são substâncias que esta produz e que são responsáveis pelo aroma e o sabor ao qual ela é conhecida. Diferentemente dos azeites e óleos lipídicos, os óleos essenciais são produzidos em mínima quantidade e são bastante voláteis. Normalmente são necessárias várias centenas de quilogramas de plantas frescas para se produzir apenas um quilograma de óleo essencial. Isso é o mesmo que dizer que o uso de uma simples gota (ou menos) do produto, equivale aromaticamente a vários centenas de gramas da erva, o que abre inúmeras possibilidades terapêuticas e de seu uso na indústria de alimentos (GROSSMAN; ZITUNE; JANUÁRIO, 2005).

As denominações dadas aos óleos essenciais ou voláteis são devidas às suas características físico-químicas. Esses são considerados óleos por serem, geralmente, líquidos de aparência oleosa a temperatura ambiente; por serem muito voláteis, quando comparados aos óleos fixos, recebem ainda o nome de óleos voláteis; e por fim, por apresentarem aroma agradável e intenso são chamados essências. A denominação de óleos é referente ao fato dos mesmos serem solúveis em solventes orgânicos apolares, contudo, com relação a composição glicéridica, estes diferem dos verdadeiros óleos e gorduras, sendo constituídos principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, ésteres e outras substâncias de baixa massa molecular (SIMÕES *et al.*, 1999; VITTI; BRITO, 2003; SIANI *et al.* 2000).

Outras características que podem ser identificadas nos óleos essenciais são sabor, geralmente, ácido e picante; quando recentemente extraídos, os óleos são geralmente incolores ou ligeiramente amarelados; normalmente são instáveis, principalmente na presença de luz, ar, calor, umidade e metais; e por fim, a maioria dos óleos essenciais possui índice de refração que varia de 1,450 a 1,590 e são opticamente ativos, propriedades estas usadas na sua identificação e controle de qualidade (BASES; BUCHBAUER, 2012; VITTI; BRITO, 2003).

São geralmente produzidos por estruturas secretoras especializadas, tais como: pelos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou em bolsas específicas. Tais estruturas podem estar localizadas em algumas partes

específicas ou em toda a planta. Assim, podemos encontrar os óleos essenciais na parte aérea, como na menta; nas flores, como é o caso da rosa e do jasmim; nas folhas, como ocorre nos eucaliptos e no capim-limão; nos frutos, como na laranja e no limão; na madeira, como no sândalo e no pau-rosa; nas cascas do caule, como ocorre nas canelas; nas raízes, como se observa no vetiver; nos rizomas, como no gengibre e nas sementes, como na noz moscada. Os óleos essenciais de diferentes órgãos de uma mesma planta podem apresentar composição química, características físico-químicas e odores distintos. Ainda vale salientar que a composição química de um óleo volátil, extraído do mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal, pode variar significativamente, de acordo com a época de coleta, condições climáticas, de solo e processo de obtenção (SIMÕES *et al.*, 1999).

3.2.1 Principais componentes dos óleos essenciais e extratos naturais

Em geral, os terpenóides são os constituintes predominantes nos óleos essenciais e extratos naturais, mas muitos desses são também compostos de outros grupos químicos, tais como fenilpropanóides. Na realidade, quase todos os óleos essenciais e extratos são extremamente complexos em sua composição, em função da presença de uma grande variedade de compostos, pertencentes a diferentes classes químicas (GIRARD, 2005).

Os terpenóides, na literatura antiga, eram chamados de terpenos, mas este termo é atualmente restrito aos hidrocarbonetos monoterpênicos. Eles são definidos como substâncias compostas de unidades de isopreno (FIGURA 2). Contudo, o isopreno não é frequentemente encontrado em óleos essenciais, na verdade não é um intermediário na biossíntese, mas o esqueleto de 2-metilbutano é facilmente discernível em terpenóides (BASER; BUCHBAUER, 2010).

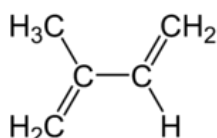


FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ISOPRENO
FONTE: MESOMO (2013)

As estruturas terpenóides sempre contêm um múltiplo de cinco átomos de carbono. Dessa forma, àqueles que contêm cinco átomos de carbono são chamados de hemiterpenóides, aqueles com 10 átomos são os monoterpenóides, com 15 átomos os sesquiterpenos, com 20 os diterpenos e assim por diante. Contudo, apenas os hemiterpenóides, monoterpenos e sesquiterpenos são suficientemente voláteis para serem componentes de óleos essenciais (BASER; BUCHBAUER, 2010).

Já os fenilpropanóides não são constituintes muito comuns nos óleos essenciais, contudo algumas espécies contêm porções significantes desses componentes. Quando ocorrem, sua natureza e propriedades alteram significativamente o valor sensorial do óleo, sendo indispensáveis no sentido de fornecer sabor e odor. Estes compostos são sintetizados a partir do aminoácido aromático fenilalanina, daí o nome desta classe (GIRARD, 2005).

No trabalho de Souza (2007) foram avaliados os principais componentes encontrados no óleo essencial de *E. intermedium* obtido via hidrodestilação. Os compostos majoritários, tanto das folhas como das inflorescências, foram os monoterpenos hidrocarbonados, sendo α -pineno (17,5%), β -pineno (20,75%) e limoneno (22,45%) os de maior concentração. Na fração sesquiterpênica, diferentemente do que ocorre nas demais espécies, o composto núcleo cariofilano foi predominante, β -cariofileno (7,65%), ainda foi encontrado o biciclogermacreno (9,4%) e uma pequena concentração de compostos núcleo aromadendrano.

3.2.2 Aplicações dos óleos essenciais e extratos naturais

Os óleos essenciais e extratos naturais tornaram-se parte integrante da vida cotidiana. Eles são utilizados numa grande variedade de formas: como aromas e aditivos alimentares, como agentes aromatizantes pela indústria de cigarros, na composição de produtos cosméticos e perfumes, em purificadores de ar e desodorizantes, na medicina e ainda como biocidas e repelentes de insetos. Assim, fica evidente o interesse dos diversos ramos industriais no estudo da obtenção de extratos de novas espécies de plantas, dos métodos de extração e avaliação da

composição química, antioxidante e antimicrobiana dos extratos (BASES; BUCHBAUER, 2012).

3.3 ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes são substâncias que, quando presentes em concentrações adequadas, geralmente baixa comparada à do substrato oxidável, é capaz de inibir ou retardar significativamente a oxidação, pela reação com radicais livres ou pelo sequestro do oxigênio singlete (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 2007; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). A reação de oxidação ocorre quando elétrons são removidos de um átomo ou de um grupo de átomos. Esse tipo de reação pode ou não envolver adição de átomos de oxigênio ou remoção de átomos de hidrogênio da substância que está sendo oxidada. Embora algumas reações de oxidação sejam benéficas aos alimentos, outras podem causar efeitos deletérios como a degradação de lipídios, vitaminas e pigmentos, com perda de valor nutricional e desenvolvimento de sabor ou coloração indesejável (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Os radicais livres são átomos ou compostos agressivos, instáveis e altamente reativos por causa de seu elétron desemparelhado. Dessa forma, eles reagem com outras moléculas para chegar a uma forma estável, mudando assim suas propriedades. Tais compostos são produtos de diferentes atividades metabólicas. Uma grande quantidade é gerada devido a poluição atmosférica, os óxidos de nitrogênio, ozônio, fumaça de cigarro e metais pesados tóxicos. Também substâncias químicas, tais como solventes orgânicos, hidrocarbonetos halogenados, pesticidas e citostáticos, geram um elevado número de radicais livres (BASES; BUCHBAUER, 2012; SPITELLER, 2001).

Os antioxidantes podem ser de ocorrência natural, exemplos são a vitamina C (ácido ascórbico) que está contida em muitas frutas cítricas, alguns membros da família da vitamina E, os quais podem ser encontrados comumente em nozes, e β -caroteno e licopeno, que pertencem à família dos carotenóides. Por outro lado, existem muitos antioxidantes sintéticos aprovados para uso em alimentos, tais como hidroxianisil butilato (BHA), hidroxitolueno butilato (BHT), galato de propila, di-*t*-butil-

hidroquinona (TBHQ), entre outros, contudo, vários estudos suspeitam que estes podem causar problemas de saúde, por isso, existe atualmente muito interesse na atividade antioxidante de substâncias que ocorrem naturalmente (SALEHI *et al.*, 2005; MADSEN; BERTELSEN, 1995; BASES; BUCHBAUER, 2012; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Dessa forma, a procura por antioxidantes naturais, tais como os óleos essenciais e extratos naturais que sejam eficazes no controle do processo de oxidação, tem despertado grande interesse na indústria alimentícia. Isso é verificado atualmente não só devido à sua utilidade como um método de preservação na indústria de alimentos, mas também por causa dos seus efeitos benéficos sobre a saúde humana, visto que o processo de oxidação pode levar a danos na membrana celular, envelhecimento, doenças cardíacas e câncer (IBAÑEZ *et al.*, 2003; SURH, 2002; MISHARINA *et al.*, 2009).

Os antioxidantes são compostos de diferentes grupos químicos e tem diferentes estruturas e propriedades (CORTESI *et al.*, 1999). Segundo Miliauskas, Venskutonis e van Beek (2004) e Shahidi, Janitha e Wanasundara (1992) as propriedades antioxidantes de uma grande variedade de plantas aromáticas e medicinais estão relacionadas principalmente aos compostos fenólicos, tais como flavonóides, ácidos fenólicos e diterpenos fenólicos. Estes compostos podem atuar como agentes redutores, doadores de hidrogênio e queladores do oxigênio, inibindo assim a reação de oxidação. Nesse sentido, é importante ressaltar que, geralmente, os óleos essenciais também apresentam altos teores de substituintes fenólicos, o que pode justificar seu poder antioxidante (BRUM, 2010; MISHARINA *et al.*, 2009).

Os polifenóis, como também podem ser chamados os compostos fenólicos, são provenientes do metabolismo secundário das plantas e englobam desde moléculas simples, até outras com alto grau de polimerização. Estruturalmente possuem pelo menos um anel aromático e um ou mais grupamentos hidroxila. Contudo, os que ocorrem naturalmente em maior proporção estão conjugados com mono e polissacarídeos, e podem também ocorrer como derivados funcionais, tais como ésteres e ésteres metílicos (BRAVO, 1998; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Os compostos fenólicos podem ser divididos em dois grupos: os flavonóides (derivados da fenilalanina e ácido acético) e os não flavonóides (derivados dos ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzóico) (BURNS *et al.*, 2001).

Na literatura podem ser encontrados diversos estudos que avaliam a atividade antioxidante de extratos vegetais. Contudo, com relação a atividade antioxidante do

óleo essencial ou extrato de *E. intermedium*, como citado anteriormente, poucos trabalhos foram encontrados. Dessa forma é evidente a importância da avaliação da atividade antioxidante do extrato de *E. intermedium* obtido via tecnologia supercrítica, pois nesse método de extração, a degradação térmica e a decomposição de compostos termolábeis são evitadas devido a operação ser realizada a baixas temperaturas e na ausência de luz e oxigênio (CORTESI *et al.* 1999; DÍAZ-REINOSO, *et al.* 2006).

3.3.1 Métodos de avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante de uma substância não pode ser medida diretamente, mas sim pelo efeito do antioxidante em controlar o grau de oxidação (ANTOLOVICH, 2002). Atualmente muitos métodos são usados para estimar a atividade antioxidante e o conteúdo de fenólicos totais de uma substância ou uma mistura de substâncias. Eles incluem: métodos de espectrofotometria de absorção no visível, métodos de fluorescência, métodos de quimioluminescência, métodos eletroquímicos e determinação do potencial redox dos antioxidantes. Estes ensaios medem a atividade antioxidante em diferentes fases de oxidação lipídica, e uma melhor estratégia é combinar os métodos que produzam qualquer informação sobre a interferência antioxidante em diferentes fases de dano oxidativo (HU; SKIBSTED, 2002).

3.3.1.1 Métodos para determinação de compostos fenólicos

Os métodos para avaliação de compostos fenólicos totais e de sua capacidade antioxidante são baseados principalmente na capacidade que estes têm de funcionarem como agentes redutores e fornecedores de hidrogênio ou elétrons (HUANG; PRIOR, 2005). Os mais comumente utilizados são Folin-Denis e Folin-Ciocalteu (SALUNKHE *et al.*, 1989), no entanto, segundo Stratil, Klejdus e Kubáň

(2007), podemos ainda citar os métodos de ferricianeto descrito por Price e Butler (1977) e o que utiliza a 4-aminoantipirina descrito por Schoonen e Sales(2002).

Contudo o método Folin-Ciocalteu é o mais utilizado na determinação de componentes fenólicos em extratos de plantas e sucos (STRATIL; KLEJDUS; KUBÁŇ, 2007). Tal método foi desenvolvido por Folin e Ciocalteu (1927) e modificado por Singleton e Rossi (1999). Isso ocorreu, pois, o método foi concebido para a análise de proteínas e posteriormente foi alterado para determinação de conteúdo de fenólicos em vinhos (HUANG; PRIOR, 2005). O método é simples, sensível e preciso e baseia-se na reação onde os compostos fenólicos são energeticamente oxidados, em meio básico, resultando na formação de um radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o qual reage com molibdato para formar óxido de molibdênio (MoO_4^+), de coloração azul (ROGINSKY; LISSI, 2005; HUANG; PRIOR, 2005). A absorbância deve ser lida a 760 nm (STRATIL; KLEJDUS; KUBÁŇ, 2006).

3.3.1.2 Método de redução do complexo fosfomolibdênio

O método de redução do complexo fosfomolibdênio é baseado na redução, em meio ácido, de Mo^{+6} para Mo^{+5} pelo analito da amostra e a subsequente formação do composto fosfato Mo^{+5} , de coloração verde. Os resultados são determinados pela leitura espectrofotométrica, no comprimento de onda de 695 nm. Tal método foi aperfeiçoado e caracterizado em relação ao intervalo de linearidade, repetitividade, reprodutibilidade e coeficientes de absorção molar para a quantificação de vários antioxidantes (PRIETO *et al.*, 1999).

Este método foi utilizado com sucesso para determinação de vitamina E em grãos por Prieto e colaboradores (1999), os quais o indicam para a avaliação da atividade antioxidante de diversos extratos. Foi aplicado também para determinação da atividade antioxidante de extrato de sálvia por Lu e Foo (2001) e extrato de gengibre por Mesomo e colaboradores (2012). E por fim, segundo Arbos e colaboradores (2004) a avaliação da atividade antioxidante pela redução do complexo fosfomolibdênio destaca-se por ser um método sensível e reprodutível, de simples execução e de baixo custo.

3.3.1.3 Método DPPH

O teste DPPH (2,2-diphenil1-picrilhidrazil) é o método indireto mais antigo utilizado para a determinação da atividade antioxidante de substâncias naturais. É um ensaio espectrofotométrico baseado na capacidade dos radicais livres DPPH reagirem com compostos antioxidantes (ROGINSKY; LISSI, 2005).

Nesse método as amostras são capazes de reduzir os radicais DPPH a forma estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, que é amarelo, a partir da doação de elétrons das amostras. A medida é feita por meio da diminuição da absorvância, determinada no comprimento de onda de 518 nm, ocasionada pela mudança de cor de púrpura para amarelo (BASES; BUCHBAUER, 2012; ROGINSKY; LISSI, 2005; MENSOR *et al.*, 2001).

A porcentagem de atividade antioxidante (% AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pela amostra, sendo que a quantidade de amostra necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50 % é denominada concentração eficiente (EC_{50}). Assim, quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua EC_{50} e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA *et al.*, 2007).

3.4 ANTIMICROBIANOS

É impossível determinar exatamente quando, na história da humanidade, tomou-se conhecimento da existência de micro-organismos e de sua importância. Após o período em que o homem tinha sua alimentação baseada em recursos da natureza, ele passou a produzir seu próprio alimento e a se deparar com problemas relacionados com a transmissão de doenças e com a rápida deterioração que estes apresentavam. Assim, passou a se preocupar com formas de controlar o desenvolvimento dos micro-organismos, visando eliminar riscos à saúde do consumidor, bem como prevenir ou retardar o surgimento de alterações indesejáveis nos alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Hoje existem inúmeras formas de controlar o desenvolvimento dos microrganismos, uma delas é a utilização de conservantes químicos, contudo, existem relatos que os correlacionam a diversos tipos de problemas de saúde (FRANCO; LANDGRAF, 2005; LV *et al.*, 2011). Essa controvérsia e a crescente demanda dos consumidores por produtos seguros e naturais, resultou em diversas pesquisas para avaliar a viabilidade de preservação com novos agentes antimicrobianos, extraídos a partir de matrizes vegetais (GOÑI *et al.*, 2009). E ainda, tendo em vista que as bactérias apresentam resistência a múltiplos agentes antimicrobianos, é notória a necessidade de encontrar novas substâncias para serem utilizadas no combate a esses micro-organismos (MICHIELIN, 2009).

Extratos e óleos essenciais de diversas plantas medicinais, especiarias e ervas mostraram-se eficientes no controle do crescimento de uma vasta gama de micro-organismos. Assim, considerando a sua excelente função antimicrobiana, os extratos e óleos essenciais possuem grande potencial como aditivos naturais para a conservação de alimentos, tanto crus quanto processados, em indústrias de produtos farmacêuticos, na medicina alternativa e também em terapias naturais (LV *et al.*, 2011; LIS-BALCHIN; DEANS, 1997).

Com relação ao mecanismo de ação dos antimicrobianos segundo Carson, Mee e Riley (2002) parece improvável que haja um único, pois a composição dos extratos e óleos essenciais é bastante heterogênea. Além disso, segundo os autores não é possível também atribuir a atividade antibacteriana a apenas um composto. Alguns possíveis mecanismos de ação dos óleos essenciais e extratos é a degradação da parede da célula, danos à membrana citoplasmática, danos a proteínas de membranas, vazamento do conteúdo das células, coagulação do citoplasma e a depleção do transporte de prótons ativos (BURT, 2004).

Os testes para avaliar a atividade antimicrobiana foram padronizados a nível internacional pela Organização Mundial de Saúde. Vários estudos foram realizados a fim de padronizar a diluição em caldos e testes de susceptibilidade antimicrobiana em meios de cultura com diluição em ágar. Os testes padronizados de disco envolvem medir o diâmetro de cada zona de inibição e comparar com a concentração mínima inibitória (CIM) obtida por testes de susceptibilidade de diluição em ágar ou caldo (SCHWALBE; STEELE-MOORE; GOODWIN, 2007).

Existem vários estudos acerca da atividade antimicrobiana de diversos extratos vegetais (ROTA *et al.*, 2008; GOÑI *et al.*, 2009; LV *et al.*, 2011; CARSON;

MEE; RILEY, 2002; SANTOS, 2012; MICHIELIN *et al.*, 2009). Contudo sobre extratos da planta *E. intermedium* não foram encontrados, demonstrando assim a necessidade da avaliação desse. Assim, é evidente a importância dos extratos e óleos essenciais para melhorar a qualidade microbiológica e segurança de alimentos, visto que estes são geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) (GOÑI *et al.*, 2009).

3.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Os óleos essenciais e extratos naturais de plantas possuem alto valor agregado, entretanto, são constituídos de uma mistura complexa de substâncias, muitas delas facilmente termodegradáveis. Dessa forma, aspectos como qualidade e composição do extrato são muito influenciados pela metodologia de extração utilizada (SIMÕES *et al.*, 1999).

Existem vários métodos de extração e estes variam de acordo com a localização do óleo na planta e com a proposta de utilização do mesmo. Os processos mais comuns são a destilação com arraste a vapor e extração por solventes orgânicos. Contudo estes apresentam alguns inconvenientes e limitações relacionados a degradação ou então hidrólise de ésteres, rearranjos, isomerização, racemização e oxidações, alterando assim a composição dos extratos obtidos e transformando-os em produtos de menor eficácia ou até mesmo tóxicos. Além de que, existe uma restrição ao uso de solventes tóxicos, já que os óleos essenciais são, geralmente, utilizados em alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos. Assim, estes fatores influenciaram no surgimento, desenvolvimento e aplicações de novas operações de extração, incluindo a extração supercrítica (SIMÕES *et al.*, 1999; STEFFANI, 2003).

3.5.1 Extração com solvente orgânico

A extração com solventes orgânicos é umas das técnicas mais antigas, desenvolvida originalmente para permitir maior extração a menores temperaturas. O processo consiste em colocar um solvente orgânico em contato com a matriz vegetal, ou seja, o solvente passa através de um leito espesso de partículas preparadas de modo que esse possa escoar facilmente. Após certo tempo, suficiente para que ocorra a transferência dos constituintes solúveis presentes na planta, efetua-se a separação das fases sólida e líquida. O extrato é obtido pela evaporação do solvente presente na fase líquida (STEFFANI, 2003; CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010; WENNERSTEN, 1992).

Uma das técnicas mais tradicionais de extração com solventes orgânicos é a de Soxhlet, que foi desenvolvida em 1879 e vem sendo considerada padrão a mais de um século (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010). O método utiliza o refluxo de solvente em um processo intermitente. O solvente é inicialmente aquecido, entra na fase vapor, posteriormente é condensado e cai no cilindro confeccionado de papel filtro, no qual se encontra a amostra, e lentamente enche-o. A solubilização das substâncias a serem extraídas da amostra ocorre até que o cilindro esteja totalmente preenchido. Logo, a mistura solvente + extrato é sifonada para o balão onde o solvente encontrava-se inicialmente. O processo se reinicia até que todo o extrato seja carregado (CAMPOMANES, 2012). Os solventes mais utilizados são os hidrocarbonetos alifáticos (éter de petróleo e o n-hexano), álcoois (etanol e metanol), cetonas (acetona e metiletilcetona), ácido acético, acetato de etila, éter etílico e água (SIMÕES *et al.*, 1999).

A extração convencional em Soxhlet apresenta diversas vantagens, tais como: a amostra entra em contato com o solvente de extração repetidas vezes, havendo sua constante renovação, o que facilita o equilíbrio da transferência; o sistema de extração é mantido em uma temperatura relativamente alta, o que pode contribuir para a extração dos compostos que se encontram nos poros da matriz sólida; não há necessidade de filtração para separação da matéria-prima do solvente ao término do procedimento; e existe a possibilidade de se realizar várias extrações simultaneamente, devido ao baixo custo do equipamento (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

Contudo, existem sérias desvantagens da extração de Soxhlet no âmbito de aplicação para obtenção de extratos com atividade biológica, que são: tempo elevado de extração, que pode variar de 1 h a 72 h; possíveis degradações dos compostos ativos devido ao aquecimento, que podem resultar na produção de resíduos indesejáveis; limitada escolha de solvente; e a utilização de elevada quantidade de solvente, necessitando de uma etapa posterior de separação, o que exige grande dispêndio de energia, além de que o extrato pode sofrer transformações oxidativas durante essa etapa (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010; GRIGONIS *et al.*, 2005; DÍAZ-REINOSO *et al.*, 2006).

3.5.2 Extração por destilação por vapor d'água

A destilação por vapor d'água é sem dúvida o método mais utilizado para a extração de óleos essenciais de plantas. Na sua forma mais simples destilação é definida como "evaporação e subsequente condensação de um líquido." Isto ocorre, devido aos movimentos moleculares induzidos termicamente dentro do líquido, resultando na ejeção de algumas das moléculas para a superfície do mesmo. O fluxo de vapor age como o transportador dessas moléculas. A liberação do óleo essencial presente em uma planta é devido à ruptura da parede celular, causado pelo aumento da pressão induzida pelo calor (BASER; BUCHBAUER, 2010).

Existem três tipos de extração via destilação por vapor d'água, cuja distinção é feita pela forma como se estabelece o contato entre a amostra e a água (líquida ou vapor). A primeira é chamada de hidrodestilação, nessa a amostra fica imersa na água contida em um recipiente; a segunda ocorre pela ação do vapor da água colocada em ebulição e separada da amostra por uma tela; e a terceira por injeção direta de vapor no material acondicionado em cesto metálico (WILLIAMS, 1996).

Dentre esses métodos o mais simples é a hidrodestilação, no qual o material vegetal absorve a água, durante o processo de ebulição, e o óleo contido nas células difunde-se através da parede celular por meio de osmose. Posteriormente, esse é vaporizado e levado pela corrente de vapor. A volatilidade dos constituintes do óleo não é influenciada pela taxa de vaporização, mas sim pelo seu grau de solubilidade em água. Como resultado, os componentes essenciais mais solúveis

em água, vão sair antes do que os mais voláteis, mas menos solúveis em água (BASER; BUCHBAUER, 2010).

Contudo, na hidrodestilação os constituintes dos óleos essenciais podem sofrer degradação térmica ou então hidrólise, comprometendo o perfil aromático do óleo essencial, o que pode afetar a reprodução das fragrâncias naturais. Por exemplo, o calor pode decompor muitos aldeídos e ésteres podem ser formados a partir de ácido gerados durante a vaporização de certos componentes do óleo essencial. Além de que, no caso de óleos ricos em ésteres, estes podem sofrer hidrólise a álcoois e ácidos. E, ainda, algumas moléculas solúveis em água podem ser perdidas pela dissolução na água. Assim, deve-se adotar certas medidas para impedir ou pelo menos limitar a extensão da degradação dos compostos de interesse (BASER; BUCHBAUER, 2010; STEFFANI, 2003).

3.5.3 Extração por fluido supercrítico

A extração por fluido supercrítico, extração por gás supercrítico ou extração por gás denso, é considerada uma tecnologia alternativa muito difundida e limpa, utilizada para obtenção de extratos a partir de plantas e diversos produtos naturais. Esse processo apresenta grande potencial na área acadêmica, na indústria química, farmaceutica, na de alimentos e na agricultura, assim como em alguns dos processos de controle de resíduos (ARAÚJO *et al.*, 2000; DÍAZ-REINOSO, *et al.* 2006; ABAROUDI *et al.*, 1999). De fato, esse método tem diversas vantagens frente às técnicas tradicionais de extração, pois é um processo flexível devido à possibilidade de ajuste contínuo do poder de solvatação e seletividade do solvente; permite a eliminação de contaminantes, tais como os solventes orgânicos; não necessita da eliminação do solvente pós-processamento, o que acaba evitando uma etapa dispendiosa; para alguns solventes cuja temperatura crítica é baixa, a degradação térmica e decomposição de compostos termolábeis são evitadas, devido à operação ser a temperatura reduzida; e por fim, o processo se dá na ausência de luz e de oxigênio, o que impede que as reações de oxidação ocorram (DÍAZ-REINOSO, *et al.* 2006; REVERCHON; DE MARCO, 2006).

Usualmente um fluido é dito em estado supercrítico quando se encontra a temperatura e pressão acima do ponto crítico (BRUNNER, 2005). Contudo, este conceito tem pouca importância prática, no caso é mais interessante saber que o estado supercrítico é obtido elevando-se a pressão e a temperatura de um gás, ou de um líquido, de forma que se altere o estado de agregação e, como consequência, modifique as propriedades da substância de interesse. Esta alteração do estado de agregação conduz a uma mudança na densidade e no poder de solvatação, o que modifica o comportamento químico da substância (LANÇAS, 2000). Fluidos supercríticos têm uma maior difusividade e baixa densidade, viscosidade e tensão superficial, quando comparado a solventes orgânicos. Nas regiões próximas ao ponto crítico o fluido tem densidade e difusividade similar à de líquido, porém viscosidade comparável à dos gases. Assim, apresenta bom poder de solvatação e alta difusividade. Suas propriedades podem ser variadas alterando-se as condições de pressão e temperatura (DÍAZ-REINOSO, *et al.* 2006; BRUNNER 2005).

O diagrama de fases, apresentado na FIGURA 3, mostra as áreas onde uma substância pura existe como gás, líquido, sólido ou como um fluido supercrítico. As curvas representam as condições de temperatura e pressão onde duas fases coexistem em equilíbrio e o ponto triplo as condições no qual as três fases coexistem. Conforme a temperatura e a pressão são aumentadas ao longo da curva de vaporização, na qual gás e líquido estão em equilíbrio, o líquido torna-se menos denso, devido à expansão térmica, e o gás torna-se mais denso, devido ao aumento da pressão. Eventualmente, as densidades das duas fases convergem e tornam-se idênticas, a distinção entre o gás e o líquido desaparece, e a curva de vaporização chega ao final no ponto crítico (CARVALHO JUNIOR, 2004). A temperatura crítica de um gás é a temperatura acima da qual o gás não pode ser liquefeito por compressão isotérmica. De maneira similar, a pressão crítica de um gás é a pressão acima da qual o gás não pode ser liquefeito por resfriamento isobárico (STEFFANI, 2003).

A extração de produtos naturais sólidos com fluido pressurizado é feita utilizando um extrator de leito fixo, o qual é formado pelo próprio material vegetal. No início do processo extrativo a matriz sólida absorve o solvente supercrítico, que é alimentado no extrator e distribuído uniformemente no interior do leito fixo de partículas sólidas, o que faz com que a estrutura das células e os canais intercelulares dilatem, diminuindo a resistência à transferência de massa. Ao mesmo tempo, ocorre a dissolução dos compostos que podem ser extraídos pelo solvente e

os mesmos são transferidos por difusão de dentro do sólido até a sua superfície. A transferência de massa do soluto da fase sólida para a fase fluida ocorre pelo escoamento do solvente através do material vegetal. Em qualquer ponto dentro do extrator a concentração de óleo na fase sólida e fluida varia continuamente até que o equilíbrio seja alcançado. O processo ocorre em regime transiente, pois o leito permanece fixo e a concentração do óleo na fase fluida varia com o tempo e a posição. A mistura soluto/solvente é facilmente separada ao final do processo (BRUNNER, 1994). De acordo com Abaroudi e colaboradores (1999), a extração com fluidos supercríticos sofre influência da temperatura, pressão, tamanho da partícula, fluxo de solvente, densidade e natureza do solvente, sendo que a taxa de extração é maior quanto maior a solubilidade do soluto no solvente.

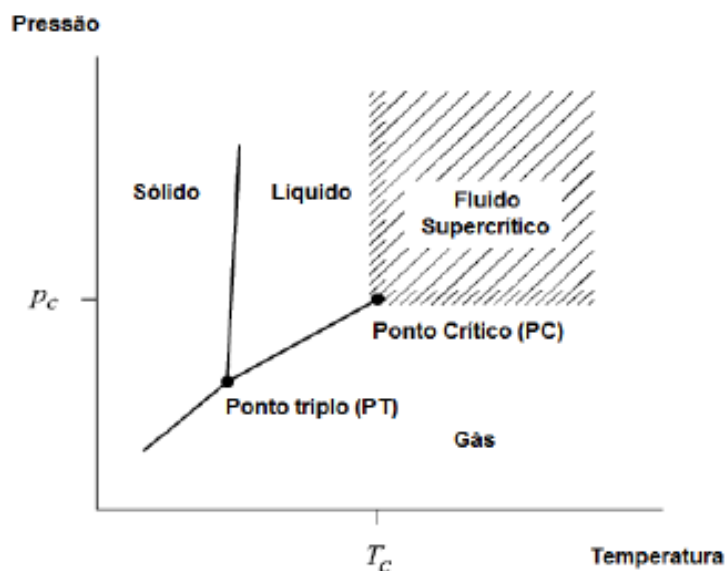


FIGURA 3 – DIAGRAMA GENÉRICO DE FASES DE UMA SUBSTÂNCIA PURA
FONTE: BRUNNER (1994)

As principais desvantagens da extração supercrítica são a periculosidade envolvida na operação, inerente aos processos a altas pressões, e as atitudes refratárias às mudanças do setor empresarial de pequeno e médio porte. Com relação a custos, deve-se levar em conta que produtos obtidos por extração supercrítica apresentam qualidade superior, relacionada à composição mais fiel dos extratos aos aromas naturais das plantas. Isto significa que são produtos de alto valor agregado (STEFFANI, 2003).

A extração supercrítica é bastante aplicada na indústria de alimentos. Como exemplos temos os processos para obtenção de vitaminas, bebidas sem álcool,

bebidas descafeinadas, batatas fritas desengordurada, encapsulamento de temperos, arroz parboilizado por CO₂, remoção de pesticidas, entre outros (BRUNNER, 2005).

3.5.3.1 Curvas de extração

O comportamento cinético de uma extração supercrítica é descrito através da construção da curva de extração, que é representada pelo gráfico da massa acumulada de extrato versus o tempo de extração, mantendo constante a vazão do solvente. A curva construída é afetada pelos parâmetros de processo e dos fenômenos que ocorrem no leito fixo durante a extração, tais como vazão de solvente e tamanho da partícula formadora do leito. Assim, seu uso para comparação entre curvas obtidas de matérias-primas diferentes e de equipamentos distintos é limitado. Contudo, as informações que ela pode fornecer, são úteis para comparar uma série de experimentos com o mesmo substrato e o mesmo equipamento (BRUNNER, 1994).

As curvas típicas de extração podem ser divididas em três etapas, como o ilustrado na FIGURA 4. São elas:

- I. Etapa com taxa de extração constante (CER): nessa etapa a superfície externa das partículas está completamente coberta por uma fina camada de extrato, formada pela ruptura das células durante o processo de moagem. Nessa etapa a convecção é o mecanismo dominante e, portanto, a resistência à transferência de massa está na fase fluida. Esta etapa representa cerca de 50 % do rendimento total obtido no processo.
- II. Etapa com taxa decrescente de extração (FER): nessa etapa a camada de extrato que recobre a superfície externa das partículas é menor, fazendo com que a área efetiva de transferência de massa diminua e, conseqüentemente, faz com que a taxa de transferência de massa não seja mais constante como antes. Dessa forma, uma vez que o óleo não cobre totalmente as partículas sólidas, inicia-se a difusão do solvente através dessas. Assim, durante esse período a difusão, bem como a convecção, caracterizam a taxa de

transferência de massa. Até o final desta etapa o rendimento atinge 70 % de seu total.

- III. Etapa difusional: esse período é controlado pela difusão, pois as partículas já não se encontram recobertas com o extrato, o qual está no interior das células não quebradas ou no interior do sólido poroso. Assim, nesta etapa a difusão é a única forma de transferência de massa (FERREIRA *et al.*, 1993; BRUNNER, 1994; FERREIRA *et al.*, 1999).

A curva de extração pode ser utilizada na determinação de parâmetros de processo, como tempo de extração, caracterização das etapas de extração supercrítica e determinação da solubilidade, como também na modelagem da transferência de massa do sistema (SILVA, 2004).

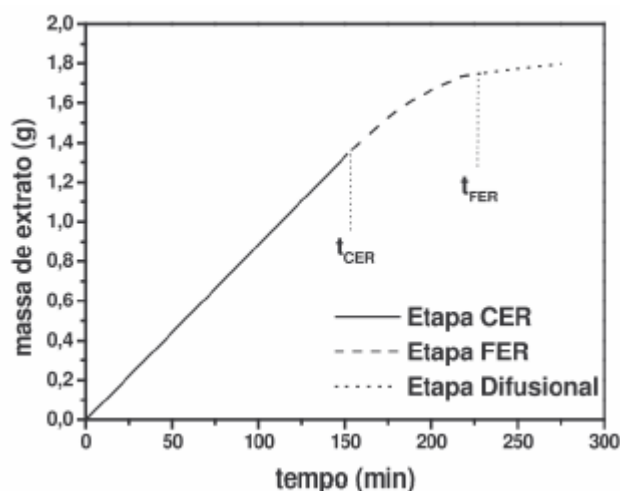


FIGURA 4 – CURVA TÍPICA DE EXTRAÇÃO COM REPRESENTAÇÃO DAS TRÊS ETAPAS DO PROCESSO.

FONTE: MARTÍNEZ (2005)

3.5.3.2 Rendimento

O rendimento de um processo de extração supercrítica pode ser expresso pela razão entre a massa de extrato obtida e a massa de matéria-prima usada, ou seja, é a máxima quantidade de material que pode ser extraído a uma determinada temperatura e pressão (MARTÍNEZ, 2005). Pode ser calculado conforme a Equação 1.

$$X_0(\%) = \frac{m_{\text{extrato}}}{m_{\text{matéria-prima}}} \times 100 \quad (1)$$

Em que X_0 é o rendimento global da extração em porcentagem, m_{extrato} é a massa de extrato obtida após o processo de extração, $m_{\text{matéria-prima}}$ é a massa de amostra utilizada no processo.

Com relação ao rendimento, sabe-se que esse não depende apenas das características da matéria-prima, mas também da forma com que os compostos nela presentes interagem com o solvente. Isto significa que as propriedades do solvente também influem no valor de X_0 . Entre estas propriedades está a densidade do solvente, que afeta diretamente o seu poder de solvatação e é função da sua temperatura e pressão (MANNINEN; PAKARINEN; KALLIO, 1997; MARTINÉZ, 2005). Dessa forma, o estudo de diferentes condições de extração é de grande importância, a fim de que se possam selecionar as melhores condições operacionais para uma dada matéria-prima.

3.5.3.3 Fluido supercrítico

A escolha do fluido é um fator chave para a eficácia e rentabilidade econômica do processo de extração via tecnologia supercrítica. Vários solventes foram testados para tal aplicação, por exemplo, hidrocarbonetos, tais como hexano, pentano e butano, óxido nitroso, hexafluoreto de enxofre, hidrocarbonetos fluorados, água, entre outros. A decisão pela utilização de um dado solvente é, deve levar em conta sua disponibilidade comercial, o custo, segurança e facilidade de manipulação. Deste ponto de vista, o dióxido de carbono é geralmente o fluido utilizado na maior parte das plantas, porque o seu estado crítico (31°C e 73,8 bar) é prontamente realizável na prática industrial, é inerte, seguro, tem grande disponibilidade, não é tóxico, não é carcinogênico, não é inflamável, não é prejudicial à saúde humana quando inalado a baixas concentrações, é facilmente removido do material extraído e ecologicamente correto (ABAROUDI *et al.*, 1999; SMITH, 1999; DANH *et al.*, 2009). Outras características interessantes do CO₂ é que sua polaridade é próxima a do pentano e do n-hexano, que são solventes usados em extrações por solventes orgânicos. Além de que, compostos lipofílicos como hidrocarbonetos, éteres, ésteres, cetonas e aldeídos são facilmente extraídos, já substâncias polares como

açúcares, polissacarídeos, aminoácidos, proteínas, fosfatídios, glicosídeos e sais orgânicos não são solúveis em CO₂ (MELECCHI, 2005).

Na TABELA 1 são apresentados alguns compostos que podem ser utilizados como fluidos supercríticos e sua respectiva temperatura crítica (T_c) e pressão crítica (P_c). Verifica-se desta tabela que existem substâncias que possuem condições brandas de temperatura e pressão, como o etano, etileno e clorotrifluormetano. Porém, estes compostos possuem desvantagens como ser reativo, caro, pouco disponível e deixar resíduos os tornam inapropriados (SANTOS, 2012).

TABELA 1 – PROPRIEDADES CRÍTICAS DE ALGUNS SOLVENTES QUE PODEM SER UTILIZADOS NA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

Substância	T _c (°C)	P _c (bar)
CO ₂	31	72,90
Água	374	217,20
Metano	-82	45,40
Etano	32	48,20
Propano	97	41,90
Propileno	91,90	46,20
Ciclohexano	280,30	40,73
Pentano	197	33,30
Benzeno	289,00	48,94
Etileno	9	49,70
Tolueno	319	40,60
Metanol	240	79,90
Etanol	241	60,60
Acetona	235	46,40
Éter etílico	194	35,90
Clorotrifluormetano	28,90	39,21
Triclorofluormetano	198,10	44,07
Amônia	374,20	220,48

FONTE: HIERRO (1994); DIEHL (2008)

O propano, embora não apresente todas as qualidades do CO₂, também apresenta moderadas temperatura e pressão críticas (97 °C e 42 bar), se dissipa após a descompressão, dispensando a etapa de evaporação do solvente, tem um

alto poder de solvatação e as pressões envolvidas na extração são menores àsquelas usadas no processo com CO₂ (SPARKS *et al.*, 2006; OLIVEIRA, 2010). Esses fatores fazem com que seja interessante o estudo e a comparação do uso destes compostos como solventes. Alguns trabalhos sugerem que o propano comprimido tem sido mais efetivo para obtenção de extratos naturais, quando comparado ao CO₂, em relação ao rendimento e maior velocidade do processo (FREITA *et al.*, 2008; ILLÉS *et al.*, 1997; ILLÉS *et al.*, 2000; CORSO *et al.*, 2010; HAMDAN *et al.*, 2008). Assim, a obtenção de maiores rendimentos em um tempo menor e, conseqüentemente, com consumo reduzido de solvente, e processos a pressões e temperaturas mais baixas, podem reduzir custos. Fator esse que torna, do ponto de vista econômico, o propano mais atrativo, visto que o custo desse não é tão baixo quanto do CO₂ (SPARKS *et al.*, 2006; ILLÉS *et al.*, 2000).

No entanto, as informações sobre as comparações entre os processos de extração empregando CO₂ supercrítico e propano comprimido ainda são escassas na literatura, especialmente no que diz respeito à obtenção de compostos bioativos. Aspectos relacionados com a cinética de extração, assim como a composição química dos extratos são extremamente importantes para melhorar a compreensão dos fenômenos envolvidos no processo de extração com fluidos pressurizados (MESOMO, 2013). Além de que, não foram encontrados na literatura trabalhos envolvendo a obtenção de extratos de *E. intermedium* via extração supercrítica com CO₂ ou propano comprimido.

3.6 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A revisão da literatura revelou o potencial da utilização de matrizes vegetais, dentre estas a plantas nativas, para obtenção de extratos naturais que apresentem efeitos antioxidantes e antimicrobianos. Visto que a substituição de compostos sintéticos, para tal finalidade, tem grande valia, devido a diversos efeitos deletérios que estes podem estar associados. Além disso, fica evidente a influência da metodologia de extração adotada na qualidade e composição química dos extratos e, nesse sentido, o grande potencial da extração supercrítica. O estudo das variáveis pressão e temperatura, que tem efeito no poder de solvatação do solvente

supercrítico, é de grande importância, pois estão relacionadas diretamente com o custo do processo e influenciam no rendimento e na qualidade biológica do extrato. Os trabalhos de Freitas et al. (2008), Illés et al. (1997), Illés et al. (2000), Corso et al. (2010), Hamdan et al. (2008) e Mesomo et al. (2012) demonstram a necessidade e importância do estudo de diferentes solventes para obtenção de extratos supercríticos, sendo o propano bastante efetivo em diversos sentidos, quando comparado ao CO₂.

De todos dos trabalhos apresentados na literatura, até o momento, não foi encontrado nenhum trabalho que tenha realizado a extração supercrítica de flores de *E. intermedium*, bem como a avaliação da composição química e da atividade biológica dos extratos. Frente ao exposto, observa-se a potencialidade da utilização de flores de *E. intermedium* para obtenção de extratos e a investigação de sua atividade biológica, diante da disponibilidade de matéria-prima, por ser uma planta nativa de grande incidência, e ausência de estudos semelhantes.

Este trabalho visa contribuir no sentido de proporcionar uma fonte alternativa para extração de compostos com atividade biológica, bem como, avaliar o processo de extração e as variáveis que influenciam na qualidade do produto obtido.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, são descritos os procedimentos de obtenção e preparo das flores de *E. intermedium* para a obtenção dos extratos e óleo essencial, e as análises de caracterização deste material. Posteriormente, são descritos os materiais utilizados, os aparatos experimentais e os procedimentos adotados, bem como as metodologias utilizadas na determinação da composição química, atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e do óleo essencial, e no tratamento dos dados experimentais. Na FIGURA 5 encontra-se ilustrado um resumo dos experimentos e análises realizados.

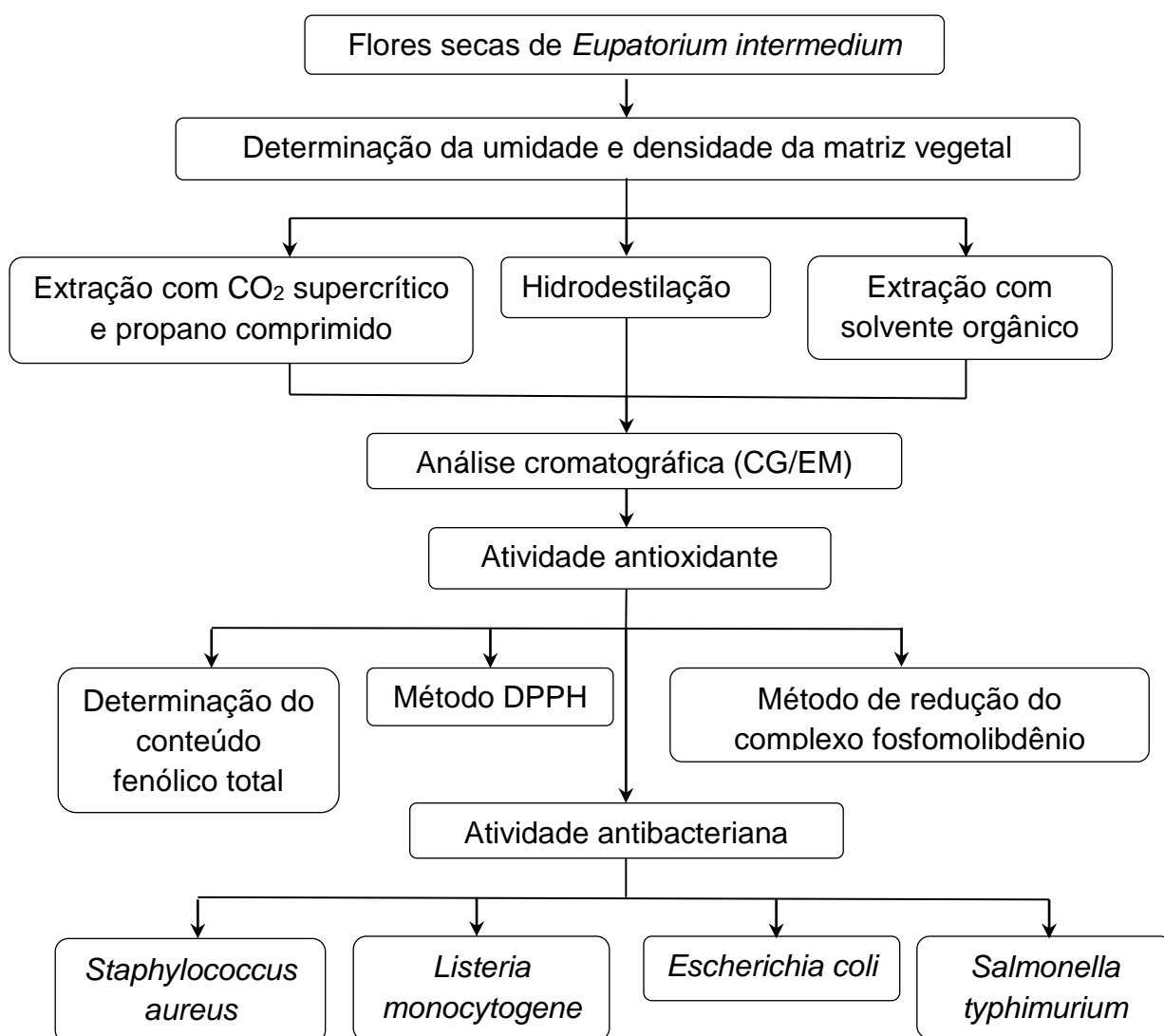


FIGURA 5 – FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS E ANÁLISES ADOTADAS PARA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E ÓLEO ESSENCIAL E ANÁLISES REALIZADAS

4.1 MATÉRIA PRIMA E COLHEITA

A matéria prima utilizada nessa pesquisa foi flores de *E. intermedium* DC com cerca de 5 cm de galho. As amostras foram coletadas em uma área de preservação ambiental situada no município de Palmeira – PR, no dia 20 de fevereiro de 2013, no período da manhã. A espécie foi localizada e georeferenciada, apresentando como coordenadas: latitude S 25° 20.461' e longitude W 049° 48. 046'.

A escolha pela extração do óleo das flores foi baseada em teste preliminares executados no Laboratório de Ecofisiologia do departamento de Fitotecnia e Fitosanitarismo, do campus Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba – PR.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE

Aproximadamente 1 kg de flores de *E. intermedium* foi coletado para a identificação botânica da espécie. A exsicata foi transportada até o Herbário das Faculdades Integradas Espírita (HFIE), onde foi herborizada sendo tombada no acervo do Herbário HFIE, sob o nº 8.250 (LAWRENCE, 1951; IBGE, 1992). As duplicatas foram enviadas ao Herbário do Museu Botânico Municipal (MBM) e Herbário da Universidade Federal do Paraná, Ciências Biológicas (UPCB).

4.3 PREPARO DA MATÉRIA PRIMA

O preparo da matéria prima foi realizado com o objetivo de obter uma maior vida útil, durante o armazenamento das amostras, e também visando uma maior exposição do soluto ao solvente, durante os processos de obtenção dos extratos.

Inicialmente, as flores de *E. intermedium* foram secas em estufa de circulação de ar a temperatura de 30 °C \pm 2 °C durante 72 horas. Esse procedimento foi

realizado no Laboratório de Fitotecnia do campus Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba – PR.

As flores secas foram transportadas, em sacos de polietileno de baixa densidade, para o Laboratório de Química Analítica Aplicada (LQAA) do departamento de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, no campus Politécnico, da UFPR. Posteriormente, foram moídas com o auxílio de um liquidificador comercial (Vithory, Brasil), no qual a amostra foi triturada durante 15 segundos. Em seguida, esse material, foi separado usando peneiras da série Tyler (Bertel, Brasil), aberturas de 8, 12, 20, 24, 32 e 48 mesh, com ajuda de um agitador mecânico (Bertel, Brasil), cujo reostato foi ajustado na posição 8 durante 15 minutos.

A granulometria da matéria prima utilizada nos experimentos de extração foi composta por uma mistura de partículas dos tamanhos 12 mesh (33 %), 20 mesh (19 %), 24 mesh (17 %), 32 mesh (17 %) e 48 mesh (14 %). As proporções foram definidas de acordo com a massa total de cada fração, as quais foram embaladas separadamente em sacos de polietileno de baixa densidade de 20 micras, fechado em seladora à vácuo (Ilanuen Maschinen AG, modelo CH9100 Herisau, Suíça) e armazenados em freezer a temperatura de $-5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Desta forma, procurou-se retardar as reações bioquímicas e proteger o material contra a ação dos micro-organismos até seu uso.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

4.4.1 Teor de umidade

O conteúdo de umidade das amostras secas e moídas foi realizado em triplicata e pelo método de destilação com tolueno, de acordo com AOCS (1994), que distingue água do material volátil. Na determinação foram utilizadas 10 g do material moído, ao qual foram adicionados 125 mL de tolueno e colocadas em um balão de fundo redondo de 500 mL. O balão foi colocado sobre a manta aquecedora e acoplado ao destilador *Clevenger*, à temperatura controlada em $100 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$. O aquecimento foi mantido até o esgotamento da água, cerca de 2 h. O destilado

contendo duas fases (aquosa e orgânica) foi coletado em frascos graduados e o volume da fase aquosa mensurado.

O teor de umidade foi calculado com o auxílio da Equação 2.

$$U = \left(\frac{V_{H_2O} \times \rho_{H_2O}}{m_{amostra}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Em que U é a umidade em porcentagem; V_{H_2O} é o volume da fase aquosa; ρ_{H_2O} é a densidade da água e $m_{amostra}$ é a massa da amostra.

4.4.2 Diâmetro médio da partícula

O diâmetro médio das partículas foi determinado utilizando o cálculo proposto por Gomide (1983), conforme a Equação 3 e 4. A metodologia se baseia no emprego das peneiras da série de Tyler, considerando a fração mássica do material moído nas seguintes séries: mesh 12, mesh 20, mesh 24, mesh 32 e mesh 48.

$$\overline{d_s} = \sqrt{\frac{\sum_l^n \frac{\Delta l_i}{d_i}}{\sum \frac{\Delta l_i}{d_i^3}}} \quad (3)$$

$$\Delta l_i = m_i / M \quad (4)$$

Em que d_s é o diâmetro médio superficial das partículas em cm; m_i é a massa de amostra retida na peneira em g; M é a massa total de amostra em g; d_i é o diâmetro médio da peneira em cm; n é o número total de frações.

4.4.3 Densidade real e aparente

A densidade real das flores secas e moídas foi determinada utilizando-se a técnica da picnometria em gás hélio, que foi realizada pelo Instituto de Química da Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brasil.

A densidade aparente foi calculada usando-se o volume total da célula de extração e a massa total da amostra de *E. intermedium*, seca e moída, necessária para empacota-la. O calculo foi feito usando-se a Equação 5.

$$\rho_a = \frac{m_{amostra}}{V_{leito}} \quad (5)$$

Em que, $m_{amostra}$ é a massa inicial colocada no leito de extração em g; e V_{leito} é o volume total da célula de extração.

4.4.4 Porosidade do leito de partículas

A porosidade total do leito de partículas foi determinada através da relação entre a densidade real e a aparente, conforme a Equação 6.

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (6)$$

Em que, ρ_a densidade aparente; ρ_r é a densidade real flores secas e moídas.

4.5 Extração com solvente orgânico

O extrato etéreo das flores foi obtido mediante o procedimento descrito pela AOAC (1999) e realizado no LQAA. Para tal, foi realizada a extração em Soxhlet, cuja composição granulométrica foi descrita anteriormente, com éter de petróleo em triplicata, das amostras secas e moídas, durante 6 h. Posteriormente à extração, os frascos foram pesados, em balança analítica, para cálculo do rendimento. O extrato obtido utilizando éter de petróleo não foi analisado, quanto sua composição química e atividade biológica, pois não pode ser aplicado em produtos alimentícios devido a possibilidade de ter resíduos tóxicos do solvente.

4.6 Hidrodestilação

O processo de hidrodestilação foi realizado segundo a metodologia da Farmacopéia Brasileira (1999), usando o aparato de Clevenger, no Laboratório de Ecofisiologia do departamento de Fitotecnia e Fitosanitarismo, do campus Agrárias da UFPR, Curitiba – PR.

Para tal, foram pesados 50 g de flores secas e moídas de *E. intermedium* (com composição granulométrica descrita anteriormente). A amostra foi inserida em um balão de 2000 mL, seguido da adição de 1000 mL de água destilada, ligou-se a manta de aquecimento e iniciou-se a destilação lentamente. Após duas horas do início da destilação, observou-se que não havia alteração no volume de extrato na parte superior do tubo coletor graduado. O óleo volátil foi então armazenado em frasco de vidro âmbar (5 mL) e acondicionado em freezer doméstico à -5 °C até a realização das análises.

4.7 Extração supercrítica e com fluido pressurizado

Os experimentos de extração foram realizados na unidade de extração supercrítica do Laboratório de Cinética e Termodinâmica Aplicada (LACTA), da UFPR, campus Politécnico. A obtenção dos extratos das flores foi realizada em um extrator batelada (0,08 m³ de volume interno, $L = 0,16$ m, $\phi = 2,52 \times 10^{-2}$ m), com controle de temperatura e pressão. O sistema era composto por um extrator encamisado para controle de temperatura, um banho ultratermostatizado, uma válvula agulha para controle de fluxo na saída do extrator, uma bomba tipo seringa de alta pressão, uma bomba de deslocamento positivo, e ainda, sensores e transdutores de pressão e temperatura. Souza *et al.* (2008) descrevem o aparato utilizado neste trabalho em detalhes. Para a determinação da cinética de extração supercrítica e subcrítica, foram usados os solventes CO₂ (White Martins S.A., 99,5 % de pureza na fase líquida) e propano (White Martins S.A., 99,5 % de pureza na fase líquida). As extrações foram conduzidas em fluxo constante de $2,0 \pm 0,2$ mL/min para os dois fluidos testados. A densidade dos solventes foi determinada a partir do site do National Institute of Standards and Tehcnology, informando os valores de pressão e temperatura de operação do sistema de extração (LINSTROM; MALLARD, 2012).

Para averiguar a influência das condições operacionais da extração, temperatura e pressão, sobre o rendimento do extrato foram realizados dois delineamentos, descritos posteriormente nos itens 4.5.3.1 e 4.5.3.2, um para o CO₂ em estado supercrítico e outro para o propano comprimido, respectivamente.

Para cada ensaio de extração, a coluna extratora foi diretamente preenchida, com flores secas e moídas, cuja composição granulométrica foi descrita anteriormente no item 4.3, formando um leito fixo de partículas. O leito foi comprimido manualmente, com o auxílio de um bastão de vidro, na medida em que a amostra foi introduzida na coluna extratora, a fim de obter uma boa compactação. Na medida do possível, a força de compactação foi padronizada, para que a porosidade do leito fosse mantida uniforme, e também para evitar a formação de caminhos preferenciais do solvente no leito. O tempo de extração, para o cálculo do

rendimento, foi de 180 min. Na FIGURA 6 é apresentado um diagrama esquemático da unidade de extração para fluidos supercríticos e pressurizados.

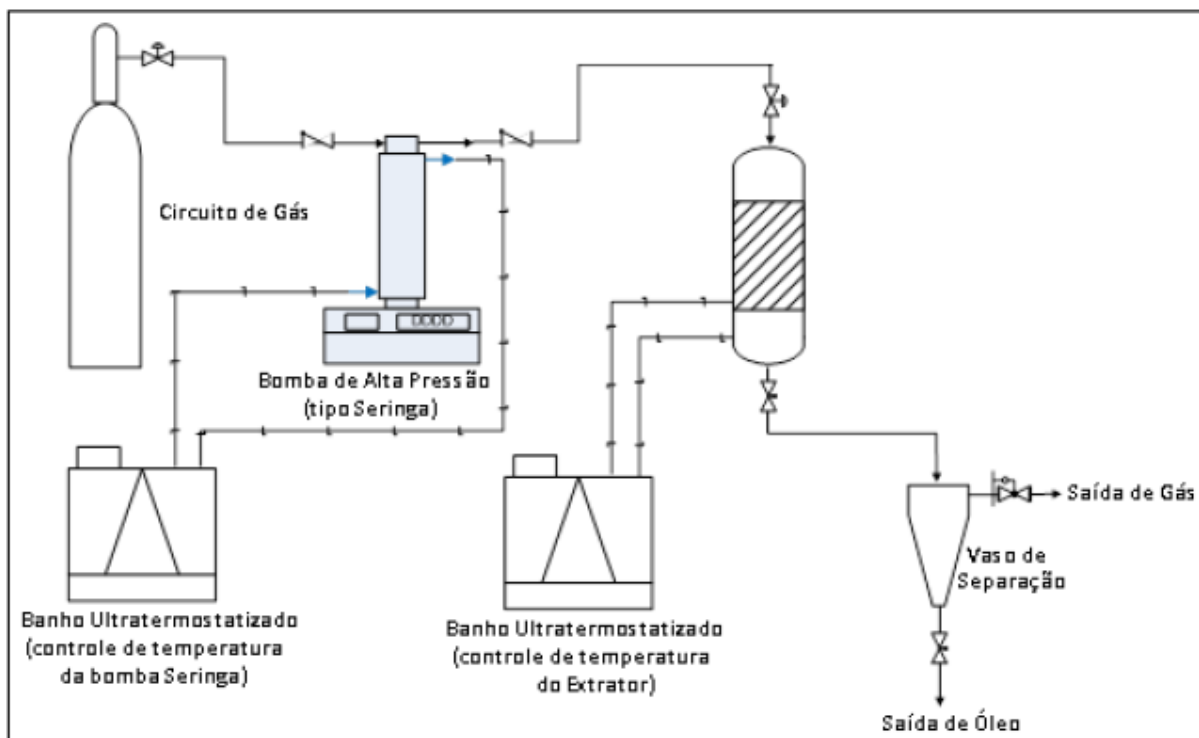


FIGURA 6 – DIAGRAMA DO APARATO EXPERIMENTAL MONTADO EM ESCALA DE LABORATÓRIO PARA A OBTENÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS UTILIZANDO FLUIDO PRESSURIZADO COMO SOLVENTE
 FONTE: MESOMO (2013)

Os níveis de pressão e temperatura de ambos os experimentos, utilizando CO₂ ou propano, foram determinados com base nos trabalhos de Mesomo e colaboradores (2012), no qual foi estudado a obtenção de extratos de gengibre usando CO₂ supercrítico e propano comprimido, de Galvão (2009), que estudou o processo de extração supercrítica de óleo de linhaça com CO₂, de Michielin e colaboradores (2011) que estudaram diferentes formas de obtenção de extrato de erva Baleeira (*Cordia verbenacea* D.C.) e avaliaram seu efeito no rendimento e atividade antioxidante e Andrade e colaboradores (2012) que avaliaram técnicas de extração e o potencial antioxidante de extratos obtidos a partir de casca e de borra de café (*Coffea arábica* L.).

4.7.1 Delineamento experimental para estudo do efeito da temperatura e pressão no rendimento de extrato das flores de *Eupatorium intermedium* DC via extração com CO₂ supercrítico

No planejamento experimental com CO₂ supercrítico foram avaliadas as variáveis X_1 (pressão em bar) e X_2 (temperatura em °C), com dois níveis de variação, utilizando o delineamento fatorial com quatro pontos cúbicos (± 1) e três repetições no ponto central, totalizando 7 experimentos aleatorizados. A TABELA 2 mostra a matriz do delineamento experimental com os níveis codificados e reais das variáveis independentes e a disposição dos diferentes experimentos. Após cada ensaio foi determinada a função resposta Y_1 (rendimento de extrato em %). O software Statistica 7.0 foi utilizado para realizar as análises de regressão múltipla e para criar os modelos de superfície de resposta. O modelo para a função resposta foi expresso como a equação (7):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + e \quad (7)$$

onde Y = resposta, x_1 e x_2 = variáveis codificadas, β = coeficientes estimados na superfície de resposta, e = resíduo (erro experimental).

TABELA 2 – MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2², COM VARIÁVEIS INDEPENDENTES (PRESSÃO E TEMPERATURA) PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE *Eupatorium intermedium*, VIA EXTRAÇÃO COM CO₂ SUPERCRÍTICO

Ensaio	Variáveis codificadas (variáveis reais)	
	Pressão (bar)	Temperatura (°C)
	$x_1(X_1)$	$x_2(X_2)$
1	-1 (150)	-1 (30)
2	1 (250)	-1 (30)
3	-1 (150)	1 (80)
4	1 (250)	1 (80)
5	0 (200)	0 (55)
6	0 (200)	0 (55)
7	0 (200)	0 (55)

4.7.2 Delineamento experimental para estudo do efeito da temperatura e pressão no rendimento de extrato das flores de *Eupatorium intermedium* via extração com propano comprimido

No planejamento experimental com propano comprimido como solvente foram avaliadas as variáveis X_3 (pressão em bar) e X_4 (temperatura em °C) com dois níveis de variação, utilizando o delineamento fatorial com quatro pontos cúbicos (± 1) e três repetições no ponto central, totalizando 7 experimentos aleatorizados. A TABELA 3 mostra a matriz do delineamento experimental com os níveis codificados e reais das variáveis independentes e a disposição dos diferentes experimentos. Após cada ensaio foi determinada a função resposta Y_2 (rendimento de extrato em %). O software Statistica 7.0 foi utilizado para realizar as análises de regressão múltipla e para criar os modelos de superfície de resposta. O modelo para a função resposta foi expresso como a equação (7).

TABELA 3 – MATRIZ DO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL 2^2 , COM VARIÁVEIS INDEPENDENTES (PRESSÃO E TEMPERATURA) PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE *Eupatorium intermedium*, VIA EXTRAÇÃO COM PROPANO COMPRIMIDO

Ensaio	Variáveis codificadas (variáveis reais)	
	Pressão (bar)	Temperatura (°C)
	$X_3(X_3)$	$X_4(X_4)$
8	-1 (30)	-1 (20)
9	1 (100)	-1 (20)
10	-1 (30)	1 (60)
11	1 (100)	1 (60)
12	0 (65)	0 (40)
13	0 (65)	0 (40)
14	0 (65)	0 (40)

4.7.3 Avaliação dos modelos delineados

Após analisar as superfícies de resposta de cada delineamento e obtidas as condições ótimas dos experimentos, a partir do modelo estatístico, foram realizados experimentos em triplicata nestas condições para validação do modelo matemático proposto.

4.7.4 Curvas de extração

As curvas de extração (rendimento x tempo) foram construídas para todas as condições experimentais dos planejamentos descritos anteriormente (itens 4.5.3.1.e 4.5.3.2). Para cada condição a coleta do extrato foi realizada em intervalos de 10 min, durante o período total de 180 min, e pesado em balança analítica (BEL Engineering, modelo YL48-1, Brasil), de forma a determinar a massa de óleo obtida em função do tempo de experimento.

4.7.5 Determinação da solubilidade dos extratos

A solubilidade dos extratos de *E. intermedium* foi calculada pelo método dinâmico. Inicialmente o soluto foi pressurizado no leito e aguardava-se um intervalo de 90 minutos para que o sistema alcançasse o equilíbrio. A solubilidade do extrato de *E. intermedium* foi calculada usando os dados experimentais das curvas de extração considerando apenas a parte linear da cinética de extração. Assim, o coeficiente angular da reta da massa de óleo extraído em função da massa de solvente utilizada corresponde ao valor da solubilidade do óleo nas condições de operação.

4.8 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

Para avaliação do potencial químico e biológico dos extratos obtidos no processo de hidrodestilação e extração supercrítica foram realizadas análises da composição química, determinação do conteúdo de fenólicos totais, atividade antioxidante e antibacteriana. A análise das amostras foi totalmente aleatorizado com três repetições. A análise de variância (ANOVA) foi aplicada após a verificação da normalidade dos resíduos, da homogeneidade de variância dos tratamentos e da aditividade do modelo. Para comparação múltipla de médias foi utilizado o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Para averiguar a influência das condições operacionais da extração com propano comprimido, temperatura e pressão, sobre a composição química e atividade biológica dos extratos foi realizados um delineamentos fatorial 2^2 , similar ao descrito anteriormente no item 4.5.3.2. Para a extração com CO_2 supercrítico não foi possível avaliar o efeito das variáveis devido a falta de extrato em uma das condições de extração (150 bar e 80 °C). O software Statistica 7.0 foi empregado para a análise estatística.

4.8.1 Composição química

A determinação da composição química dos extratos foi realizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP por cromatografia a fase gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) (HP6890/ HP5975), com coluna capilar de sílica fundida HP5-MS (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm) usando hélio como gás de arraste (1 mL/min). As temperaturas do injetor e do detector foram 250 °C e 280 °C. O volume de injeção foi de 1 mL (amostra de 15 mg/mL). A programação de aquecimento da coluna utilizada foi de 60 °C a 240 °C a 3 °C/min (ADAMS, 1995).

A identificação dos compostos foi realizada pelo banco de dados do sistema CG/EM da biblioteca NIST-11, com o índice de retenção relativo a uma série de n-alcanos (C8-C30, C32) e por comparação dos espectros de massas obtidos com dados da literatura (ADAMS, 1995).

4.8.2 Avaliação da atividade antioxidante total

4.8.2.1 Determinação do conteúdo fenólico total (FT)

O conteúdo fenólico total dos extratos obtidos via tecnologia supercrítica (CO₂ e propano comprimido) e hidrodestilação foi determinado usando a metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965). Para execução do ensaio foi preparado uma solução etanólica com o extrato de *E. intermedium* na concentração de 6 mg/mL. A análise foi realizada em balões volumétricos de 10 mL, sendo transferido para estes 100 µL de cada uma das soluções etanólicas dos extratos, as quais foram adicionados 2 mL de água destilada e 0,5 mL do reativo de Folin- Ciocalteau. Depois de 30 segundos e antes de 8 minutos após a adição do reativo, foi adicionado 1,5 mL de solução aquosa de carbonato de sódio a 20 % (m/v). Os balões foram completados com água destilada até a marca de 10 mL, agitados e deixados em repouso ao abrigo da luz e temperatura ambiente (20 °C) por 2 horas para que a reação ocorresse. A absorbância de cada uma das soluções foi medida a 765 nm em espectrofotômetro (Bel Photonics, 2000UV) e o branco realizado com todos os reagentes, substituindo-se a amostra por etanol.

Para interpretar os resultados foi construída uma curva padrão com ácido gálico em solução, com diferentes concentrações (0, 20, 30, 40, 50, 70, 90 e 100 µg/mL). A concentração de fenólicos totais foi calculada e expressa em mg equivalente de ácido gálico (GAE) por g de flores, como média ± desvio padrão. Para a execução do ensaio da curva padrão pipeta-se 100 µL de cada solução de ácido gálico das diferentes diluições e procede-se assim como na análise do extrato.

4.8.2.2 Método de redução do complexo fosfomolibdênio

A determinação da atividade antioxidante via método de redução do complexo fosfomolibdênio foi realizado conforme o descrito por Prieto *et al.* (1999). No qual uma alíquota de 0,10 mL da solução (0,01 g de extrato e 25 mL de etanol) foi

combinada com 1,5 mL da solução reagente (ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônia 4 mM). As amostras foram incubadas a 95 °C por 90 minutos. Em seguida, foram resfriadas até temperatura ambiente, centrifugadas e a absorbância da solução foi medida a 695 nm contra um branco (1,5 mL da solução reagente e 0,10 mL de etanol).

Para interpretar os resultados foi construída uma curva padrão com α -tocoferol em solução, com diferentes concentrações (0, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 $\mu\text{g/mL}$). A atividade antioxidante foi calculada e expressa em mg de α -tocoferol / g de extrato, como média \pm desvio padrão. Para a execução do ensaio da curva padrão pipeta-se 0,10 mL de cada solução de α -tocoferol das diferentes diluições e procede-se assim como na análise do extrato.

4.8.2.3 Método DPPH

A determinação da atividade antioxidante dos extratos pelo método DPPH foi realizada em triplicata de acordo com o descrito por Mensor e colaboradores (2001).

Para tal foi preparada diariamente uma solução de DPPH 0,3 mM em etanol P.A., homogeneizada durante 5 minutos em ultrassom. Posteriormente foi preparada uma solução estoque, de cada extrato, em etanol na concentração de 10,0 mg/mL, as quais foram homogeneizada durante 5 minutos em ultrassom. A partir da solução estoque foram preparadas as diluições nas concentrações finais de 2500, 3500, 4500, 5500, 6500, 7500 e 8500 $\mu\text{g/mL}$.

Em ambiente escuro foi transferida uma alíquota de 2,5 mL de cada diluição do extrato para tubos de ensaio com 1,0 mL do radical DPPH 0,3 mM. Os tubos foram mantidos em repouso durante 30 min para que a reação ocorresse. A absorbância de cada uma das soluções foi medida a 518 nm em espectrofotômetro (Bel Photonics, 2000UV). Foi preparado um branco para cada diluição, o qual era composto 1,0 mL de etanol e 2,5 mL do extrato na diluição desejada. O controle foi preparado a partir de 1,0 mL da solução de DPPH 0,3 mM e 2,5 mL de etanol. O percentual de inibição das amostras testadas sobre o radical DPPH foi calculado convertendo em porcentagem de atividade antioxidante (AA%) conforme a equação 8.

$$AA(\%) = 100 - \left\{ \frac{[(abs_{amostra} - abs_{branco}) \times 100]}{abs_{controle}} \right\} \quad (8)$$

Em que $abs_{amostra}$ é a absorbância da amostra para uma dada diluição; abs_{branco} é a absorbância do branco da respectiva diluição e $abs_{controle}$ é a absorbância do controle.

O valor de EC_{50} foi calculado pela regressão linear, plotando-se os valores de concentração no eixo das abscissas e da porcentagem de atividade antioxidante nas ordenadas.

4.8.3 Avaliação da atividade antibacteriana

As propriedades antibacterianas dos extratos de flores de *E. intermedium* foram testadas pelo método de difusão em ágar (BAUER *et al.*, 1996). Foram testadas duas cepas de bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), e *Listeria monocytogenes* (ATCC19111) e duas cepas de bactérias Gram-negativas, *Escherichia coli* (ATCC25922) e *Salmonella typhimurium* (ATCC14028).

As cepas selecionadas foram inoculadas em 10 mL de caldo tripticase de soja (TSB) a 37 °C por 24 horas. Suspensões dessas bactérias (100 µL) foram preparadas, comparando-se com tubo padrão de turbidimetria 0,5 da escala Mc Farland, e semeadas usando swab estéril em placas contendo ágar tripticase de soja (TSA). Depois da completa absorção do inoculo, pelo meio de cultura, foram feitos poços (orifícios) de 7 mm de diâmetro. Os extratos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) (0,1 g de extrato ou óleo essencial em 7 mL de DMSO) e 40 µL dessa solução foram adicionadas nos diferentes poços (orifícios) nas placas. As placas foram mantidas à temperatura ambiente (20 °C), por 3 horas, para a difusão da solução no meio de cultura antes do crescimento das bactérias e incubadas a 37°C por 24 horas. Como controle negativo foi usado 40 µL de DMSO. A atividade antibacteriana foi determinada pela formação ou não de halos de inibição ao redor dos poços (orifícios). Os ensaios foram realizados em triplicata e os diâmetros dos halos de inibição (em mm) foram medidos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo, primeiramente, é apresentada a caracterização do leito de extração e da matriz vegetal utilizada nos experimentos. Também são apresentados e discutidos os resultados referentes ao rendimento do óleo essencial, obtido por hidrodestilação, e dos extratos obtidos via tecnologia supercrítica, utilizando CO₂ supercrítico e propano comprimido como solventes, e por extração com solvente orgânico. Juntamente, são discutidos os efeitos dos parâmetros pressão e temperatura no rendimento dos extratos supercríticos. Posteriormente, apresentam-se as curvas de extração, utilizando CO₂ supercrítico e propano comprimido. Em seguida, são apresentados os resultados da composição química dos extratos supercríticos e do óleo essencial. E por fim, os resultados e discussões referentes à atividade biológica dos extratos e do óleo essencial, conduzido mediante análises de atividade antioxidante e antimicrobiana.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO LEITO E DA MATRIZ VEGETAL

O leito de extração foi formado com $13,5 \pm 0,2$ g de flores secas e moídas de *Eupatorium intermedium* com umidade de $7,81 \pm 0,04$ %. As partículas que foram utilizadas no processo apresentaram diâmetro médio de $4,50 \times 10^{-4}$ m, densidade real de $1290,00 \text{ kg/m}^3$, densidade aparente de $122,97 \text{ kg/m}^3$ e porosidade de 0,90.

5.2 EFEITO DA PRESSÃO E TEMPERATURA NO RENDIMENTO DE EXTRATO DE *Eupatorium intermedium* UTILIZANDO CO₂ SUPERCRÍTICO COMO SOLVENTE

A TABELA 4 apresenta as condições experimentais aplicadas na obtenção dos extratos de *E. intermedium* utilizando CO₂ supercrítico como solvente, o rendimento obtido em cada processo, as densidades e as vazões mássicas de CO₂ em cada condição. O rendimento da extração foi calculado no final do tempo de

extração (180 min) para permitir a comparação direta entre os resultados obtidos nas diferentes condições experimentais. Os resultados obtidos nas extrações foram correlacionados com os valores obtidos com éter de petróleo, os quais também podem ser visualizados na TABELA 4, visto que é a metodologia oficial para determinação de extrato etéreo.

TABELA 4 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E RENDIMENTOS OBTIDOS NOS EXTRATOS DE *Eupatorium intermedium* USANDO CO₂ NO ESTADO SUPERCRÍTICO COMO SOLVENTE

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Densidade (g/cm ³) ^a	Vazão (kg/h)	Rendimento (%) ^b	Porcentagem de extração ^c (%)	Solubilidade (g _{ext} /kg _{solvente})	Razão E/S ^d (g _{ext} / kg _{solve})
150	30	0,847	0,10	3,18	33,79	1,657	1,33
250	30	0,992	0,24	4,14	44,00	2,017	0,72
150	80	0,427	0,10	0,65	6,91	0,658	0,27
250	80	0,686	0,16	5,85	62,17	3,524	1,50
200	55	0,755	0,18	4,67 ± 0,06 ^e	49,63	2,67 ± 0,06	1,08 ± 0,01

^aLINSTROM; MALLARD, 2012.

^b(massa de extrato dividida pela massa de material seco no leite) x 100.

^c (massa de extrato obtida na extração com solvente pressurizado no final do tempo total de extração dividida pela massa de extrato obtido com éter de petróleo) x100.

^d (razão entre a massa de extrato e a massa de solvente).

^eValores médios e desvio padrão de triplicata.

A extração com éter de petróleo resultou em um rendimento de 9,41 % em relação ao material seco alimentado no extrator (desvio padrão de 0,15 %, baseado na triplicata dos ensaios). Pode-se observar que o maior rendimento de extrato (5,85 %), utilizando CO₂ supercrítico como solvente, foi obtido no ensaio de maior pressão e maior temperatura avaliada, ou seja, 250 bar e 80 °C, o que corresponde a 62,17 % do total obtido na extração com solvente orgânico. Já o menor rendimento (0,65 %) foi no experimento realizado a menor pressão e maior temperatura estudado, 150 bar e 80 °C, o qual representa apenas 6,91 % do rendimento obtido com o solvente orgânico. O menor rendimento obtido foi na condição de menor densidade do solvente, quando comparada com as demais condições de pressão e temperatura aplicadas nesse estudo, resultando em menor solubilidade do extrato e também em baixas taxas de transferência de massa durante a extração (MESOMO, 2013; LINSTROM; MALLARD, 2012). O rendimento de óleo essencial obtido por hidrodestilação foi 1,01 %, o qual representa 10,72 % do total obtido pela extração com éter de petróleo. Os óleos essenciais são constituídos somente pela fração

volátil, enquanto os extratos obtidos com solventes orgânicos ou por tecnologia supercrítica são compostos pela fração volátil e a oleoresina que pode ser composta de ácidos graxos, metil ésteres de ácidos graxos, pigmentos, cumarinas, psoralenos, esteróis e flavonas (REVERCHON, 1997). Este fato pode justificar a diferença no rendimento obtido na hidrodestilação. Pode-se mencionar que os resultados estão condizentes com os de Souza (2007), que obteve um rendimento de 0,9 % de óleo essencial também utilizando as inflorescências de *E. intermedium*.

A TABELA 5 apresenta os efeitos das variáveis X_1 (pressão) e X_2 (temperatura) sobre a função resposta Y_1 (rendimento de extrato em %) e a TABELA 6 a análise de variância para predição do modelo matemático sobre a função resposta Y_1 .

TABELA 5 - EFEITO DAS VARIÁVEIS PRESSÃO E TEMPERATURA SOBRE A RESPOSTA Y_1 (RENDIMENTO DE EXTRATO EM %)

Fonte de variação	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t (2)	p
Média	3,9757	0,0210	188,9224	0,0000*
(X_1) pressão em bar	1,5400	0,0278	55,3185	0,0003*
(X_2) temperatura em °C	-0,2050	0,0278	-7,3638	0,0179*
(X_1) x (X_2)	1,0600	0,0278	38,0863	0,0007*

*valores significativos ao nível de 95% de confiança

TABELA 6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA PREDIÇÃO DO RENDIMENTO DE EXTRATO DE *Eupatorium intermedium* UTILIZANDO CO₂ SUPERCRÍTICO COMO SOLVENTE

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
(X_1) pressão em bar	9,4864	1	9,4864	3060,13	0,0003*
(X_2) temperatura em °C	0,1681	1	0,1681	54,23	0,0179*
(X_1) x (X_2)	4,4944	1	4,4944	1449,81	0,0007*
Falta de ajuste	2,5307	1	2,5307	816,35	0,0012*
Erro puro	0,0062	2	0,0031		
Total	16,6858	6			

Observação $R^2 = 0,8480$. *valores significativos ao nível de 95% de confiança

De acordo com os parâmetros de regressão (TABELA 5) o efeito da variável X_1 (pressão) e a interação X_1X_2 foram significativos e positivos sobre a função resposta Y_1 , enquanto o efeito da variável X_2 (temperatura) foi significativo e negativo. Assim, como todos os parâmetros tiveram efeitos significativos o modelo matemático é representado pela seguinte equação $Y_1 = 3,9757 + 1,54x_1 - 0,205x_2 + 1,06x_1x_2$. Contudo, segundo os dados apresentados na TABELA 6, a falta de ajuste do modelo foi significativa (ao nível de 95 %), bem como, apenas 84,80 % dos dados experimentais seriam adequadamente ajustados a equação proposta. Assim, o modelo não é válido para prever o comportamento da obtenção de extratos a partir de *E. intermedium* utilizando CO₂ supercrítico como solvente, para o intervalo das condições avaliadas nesse trabalho.

Este comportamento está relacionado com os efeitos destas variáveis no rendimento. Na pressão de 250 bar quando elevou-se a temperatura de 30 °C para 80 °C o rendimento de extrato aumentou em 41,30 %, já na pressão de 150 bar, quando procedeu-se da mesma forma, o rendimento caiu 79,56 %. Assim, a falta de ajuste do modelo e o baixo valor de R^2 existem devido ao efeito contrário que a temperatura apresenta e que ocorre comumente em diversos sistemas submetidos a extração supercrítica (MICHIELIN, 2009; SILVA, 2004; MICHIELIN, 2002; McHUNG & KRUKONIS, 1986). Esse fenômeno pode ser explicado pelo efeito complexo que a temperatura tem sobre a solubilidade de um soluto em um fluido supercrítico. Uma elevação na temperatura aumenta a solubilidade devido ao seu efeito na pressão de vapor do soluto e, reduz a solubilidade devido à diminuição da densidade do solvente (CARERI *et al.*, 2001). A partir da TABELA 4, pode-se visualizar que na pressão de 250 bar a elevação da temperatura levou a um aumento na solubilidade, de 2,017 para 3,524 g_{ext}/kg_{solvente}, assim, tal comportamento, possivelmente, é dominado pelo efeito da temperatura na pressão de vapor do soluto, resultando em um aumento no rendimento de extrato. Já, na pressão de 150 bar, a solubilidade diminuiu de 1,65 para 0,658 g_{ext}/kg_{solvente}, fenômeno que pode ter sido ocasionado pela diminuição da densidade do solvente com o aumento da temperatura, levando a diminuição no rendimento de extrato. Comportamentos similares foram evidenciados por diversos autores (MESOMO *et al.*, 2012; MICHIELIN *et al.*, 2009; MICHIELIN *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2009).

A TABELA 4 também apresenta os resultados da razão entre a massa de extrato com a massa de solvente utilizada para cada condição avaliada no

delineamento experimental. Pode-se verificar que a maior razão ($1,50 \text{ g}_{\text{ext}}/\text{g}_{\text{solvente}}$) foi obtida na condição de 250 bar e 80°C . A segunda maior razão ($1,33 \text{ g}_{\text{ext}}/\text{g}_{\text{solvente}}$) não correspondeu ao segundo maior rendimento obtido, demonstrando que nem sempre um maior rendimento está relacionado a uma maior eficiência do processo de extração, nesse caso, relacionado ao maior gasto de solvente.

5.3 EFEITO DA PRESSÃO E TEMPERATURA NO RENDIMENTO DE EXTRATO DE *Eupatorium intermedium* UTILIZANDO PROPANO COMPRIMIDO COMO SOLVENTE

A TABELA 7 apresenta as condições experimentais aplicadas na obtenção dos extratos *E. intermedium* utilizando propano comprimido como solvente, o rendimento obtido em cada processo, as densidades e as vazões mássicas do propano em cada condição. O rendimento da extração foi calculado no final do tempo de extração (180 min) para permitir a comparação direta entre os resultados obtidos nas diferentes condições experimentais. Os resultados obtidos nas extrações foram correlacionados com os valores obtidos com éter de petróleo, os quais também podem ser visualizados na TABELA 7, visto que é a metodologia oficial para determinação de extrato etéreo.

Pode-se observar que o maior rendimento de extrato (9,34 %) foi obtido na pressão de 100 bar e temperatura de 60°C , correspondente a 99,26 % do total obtido na extração com solvente orgânico. Já o menor rendimento (6,41 %) foi no experimento realizado a 30 bar e 20°C , o qual representa 68,11 % do rendimento obtido com o solvente orgânico.

Como pode ser visualizado ainda nas TABELAS 4 e 7, a extração com propano permitiu a obtenção de maiores rendimento de extrato em todas as condições investigadas, quando comparadas com a extração com CO_2 . Portanto, pode-se concluir que o propano é mais eficiente para obtenção de extratos de *E. intermedium*, uma vez que o rendimento máximo de extrato usando propano comprimido como solvente foi 37 % maior que o obtido com CO_2 supercrítico. Isso provavelmente ocorreu devido à maior capacidade de solubilização de óleos, ceras e resinas no propano (ILLÉS *et al.*, 1997). Esses resultados encontram-se em

concordância com os obtidos por Illés *et al.* (1997), Illés *et al.* (2000), Corso *et al.* (2010) e Freitas *et al.* (2008), os quais também evidenciaram que o poder de solvatação do propano foi muito maior que do CO₂.

TABELA 7 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E RENDIMENTOS OBTIDOS NOS EXTRATOS DE *Eupatorium intermedium* USANDO PROPANO COMPRIMIDO COMO SOLVENTE

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Densidade (g/cm ³) ^a	Vazão (kg/h)	Rendimento (%) ^b	Porcentagem de extração ^c (%)	Solubilidade (g _{ext} /kg _{solvente})	Razão E/S ^d (g _{ext} / kg _{solvente})
30	20	0,506	0,061	6,41	68,11	13,82	4,37
100	20	0,522	0,063	6,60	70,14	12,51	4,36
30	60	0,435	0,052	8,91	94,61	19,31	7,12
100	60	0,467	0,056	9,34	99,26	20,02	6,94
65	40	0,486	0,058	8,06 ± 0,25 ^e	85,65	18,77 ± 1,16	5,70 ± 0,17

^aLINSTROM; MALLARD, 2012.

^b(massa de extrato dividida pela massa de material seco no leito) x 100.

^c (massa de extrato obtida na extração com solvente pressurizado no final do tempo total de extração dividida pela massa de extrato obtido com éter de petróleo) x100.

^d (razão entre a massa de extrato e a massa de solvente ao final do processo).

^eValores médios e desvio padrão de triplicata.

A TABELA 8 apresenta os efeitos das variáveis X₃ (pressão) e X₄ (temperatura) sobre a função resposta rendimento de extrato em % (Y₂) e a TABELA 9 a análise de variância para predição do modelo matemático sobre a função resposta Y₂.

TABELA 8 – EFEITO DAS VARIÁVEIS SOBRE A RESPOSTA Y₂ (RENDIMENTO DE EXTRATO EM %)

Fonte de variação	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t (2)	p
Média	7,9209	0,0954	83,0425	0,0001*
(X ₃) pressão em bar	0,1550	0,1262	1,2284	0,3442
(X ₄) temperatura em °C	1,3100	0,1262	10,3819	0,0091*
(X ₃) x (X ₄)	0,0600	0,1262	0,4755	0,6813

*valores significativos ao nível de 95% de confiança

De acordo com os parâmetros de regressão (TABELA 8) a variável X₄ (temperatura) apresentou efeito significativo e positivo sobre a função resposta Y₂,

enquanto que o efeito da variável X_3 (pressão) e a interação X_3X_4 não foram significativos. Assim, observa-se que o aumento da temperatura ocasionou elevação de aproximadamente 1,4 vezes no rendimento de extrato. Possivelmente a pressão não teve efeito significativo sobre o rendimento devido ao baixo efeito da pressão sobre a densidade de um líquido, uma vez que nas condições experimentais investigadas o propano é um líquido comprimido (CORSO *et al.*, 2010).

TABELA 9 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA PREDIÇÃO DO RENDIMENTO DE EXTRATO DE *Eupatorium intermedium* UTILIZANDO PROPANO COMPRIMIDO COMO SOLVENTE

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
(X_3) pressão em bar	0,0961	1	0,0961	1,5089	0,3442
(X_4) temperatura em °C	6,8644	1	6,8644	107,7837	0,0092*
(X_3) x (X_4)	0,0144	1	0,0144	0,2261	0,6813
Falta de ajuste	0,1047	1	0,1047	1,6445	0,3282
Erro puro	0,1273	2	0,0637		
Total	7,2070	6			

Observação $R^2 = 0,9678$. *valores significativos ao nível de 95% de confiança

Portanto, o modelo matemático pode ser descrito como $Y_2 = 7,9209 + 1,31x_4$, considerando apenas as variáveis significativas (TABELA 8). A falta de ajuste do modelo não foi significativa (ao nível de 95 %) e 96,78 % (R^2) dos dados experimentais foram adequadamente ajustados ao modelo proposto (TABELA 9).

Dessa forma, pode-se estabelecer que o processo realizado a 30 bar e 60 °C é o mais eficiente. Tal conclusão foi estabelecida considerando que: a pressão não teve efeito significativo sobre o rendimento, e que o custo da operação da compressão aumenta com a pressão, assim $x_3 = -1$ (30 bar); e a temperatura tem efeito positivo e significativo sobre a resposta, assim $x_4 = +1$ (60 °C). Para testar o modelo proposto foi realizada a repetição dessa condição de extração. A resposta obtida experimentalmente (Y_2) foi de 9,05 % de rendimento e a resposta do modelo (\hat{Y}_2) foi de 9,23 %. O erro referente ao modelo foi de 1,95 % comprovando que os resultados experimentais foram adequadamente ajustados ao modelo proposto.

Na TABELA 7 pode-se observar ainda que a solubilidade dos extratos variou nas diferentes condições de extração. O maior valor, 20,02 g_{ext}/kg_{solvente}, foi obtido na condição de maior rendimento de extrato, 100 bar e 60 °C. A temperatura

apresentou efeito significativo e positivo sobre a solubilidade, enquanto a pressão e a interação entre a pressão e temperatura não foram significativos. De acordo com Freitas e colaboradores (2008), com o aumento da temperatura as propriedades de transporte do solvente (coeficiente de difusão e viscosidade) são favorecidas, facilitando a penetração do solvente nos poros da matriz vegetal e a solubilização do óleo. Nos ensaios realizados utilizando CO₂ supercrítico como solvente, a solubilidade dos extratos foi menor em todas as condições quando comparado com os ensaios utilizando propano comprimido como solvente. Sendo que, no ensaio de maior rendimento de extrato para o CO₂ a solubilidade foi aproximadamente 6 vezes menor que para o propano comprimido.

A TABELA 7 também apresenta os resultados da razão entre a massa de extrato com a massa de solvente utilizada para cada condição avaliada no delineamento experimental. Pode-se verificar que a maior razão (7,12 g_{ext}/g_{solvente}) foi obtida na condição de 30 bar e 60°C, a qual apresenta o segundo maior rendimento de extrato e corresponde a condição de maior eficiência segundo a análise estatística do delineamento fatorial. Como pode ser visualizado nas tabelas 4 e 7, todos os experimentos em que o propano comprimido foi utilizado apresentaram maior relação entre massa de extrato e massa de solvente, quando comparadas as extrações com CO₂ supercrítico. Isso significa que uma quantidade maior de óleo foi extraída consumindo menos propano, sendo que, de acordo com Ribas (2012) um solvente ideal é aquele que extrai a máxima quantidade de óleo com a menor quantidade de solvente possível.

5.4 CURVAS DE EXTRAÇÃO

As curvas de extração para a obtenção de extratos de *E. intermedium* usando as condições descritas na TABELA 2, utilizando CO₂ supercrítico como solvente são apresentadas na FIGURA 7. Para todas as extrações a vazão volumétrica de CO₂ foi de $2,0 \pm 0,1$ cm³/min, e as vazões mássicas são representadas na TABELA 4.

A partir da FIGURA 7 pode-se observar que a maior taxa de extração foi na condição de 250 bar e 80 °C durante todo o período de extração. Assim, essa condição pode ser considerada como a mais eficiente, uma vez que o extrato foi

obtido com uma alta taxa inicial e o maior rendimento de extrato. Pode-se verificar também que durante a parte inicial a taxa de extração a 250 bar e 30 °C e 200 bar e 55 °C foram praticamente iguais, contudo a partir de 100 minutos a taxa na segunda condição foi maior e se mantém até o final do processo. E por fim, a análise das curvas de extrações evidenciam que a pior condição de extração, devido à baixa taxa de extração e baixo rendimento foi a 150 bar e 80 °C.

As curvas obtidas para extração com CO₂ (FIGURA 7) mostram o comportamento típico, contudo, apenas duas das três etapas foram observadas. Na primeira etapa a taxa de extração é constante (CER), na segunda etapa a taxa é decrescente (FER). A terceira etapa, a qual é lenta e o principal mecanismo de extração é a difusão intrapartícula, não foi atingida. Essa etapa deveria ser alcançada caso o processo fosse estendido para um período maior de tempo, contudo o volume de CO₂ disponível para o processo na bomba restringe o tempo em 180 minutos.

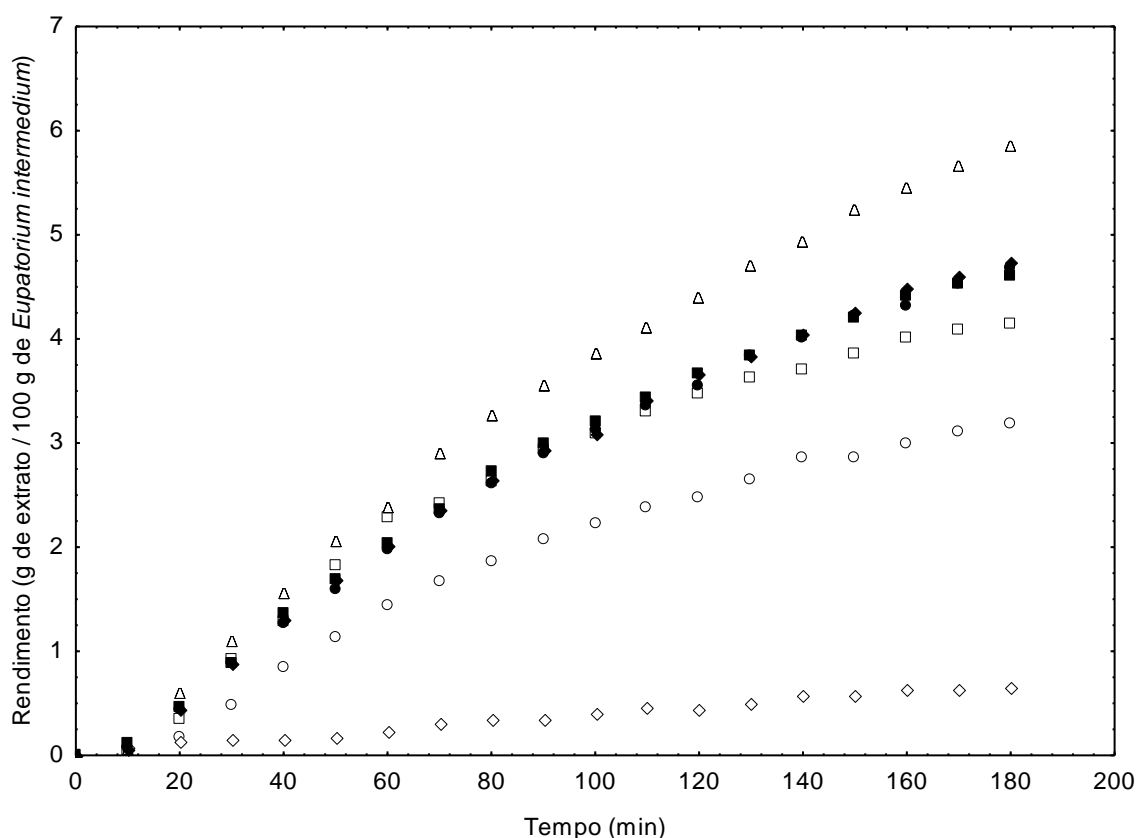


FIGURA 7 - CURVAS CINÉTICAS EXPERIMENTAIS PARA O PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE *E. intermedium* USANDO CO₂ SUPERCRÍTICO COMO SOLVENTE. (○) 150 BAR E 30 °C, (□) 250 BAR E 30 °C, (◇) 150 BAR E 80 °C E (△) 250 BAR E 80 °C. OS SÍMBOLOS PREENCHIDOS SÃO AS TRIPLICATAS DO PONTO CENTRAL (200 BAR E 55 °C).

Na Figura 8 são apresentadas as curvas de extração para a obtenção de extratos de *E. intermedium*, usando as condições descritas na Tabela 3 e utilizando propano comprimido como solvente. Em todas as extrações a vazão volumétrica de propano também foi de $2,0 \pm 0,1 \text{ cm}^3/\text{min}$, e as vazões mássicas são apresentadas na TABELA 7.

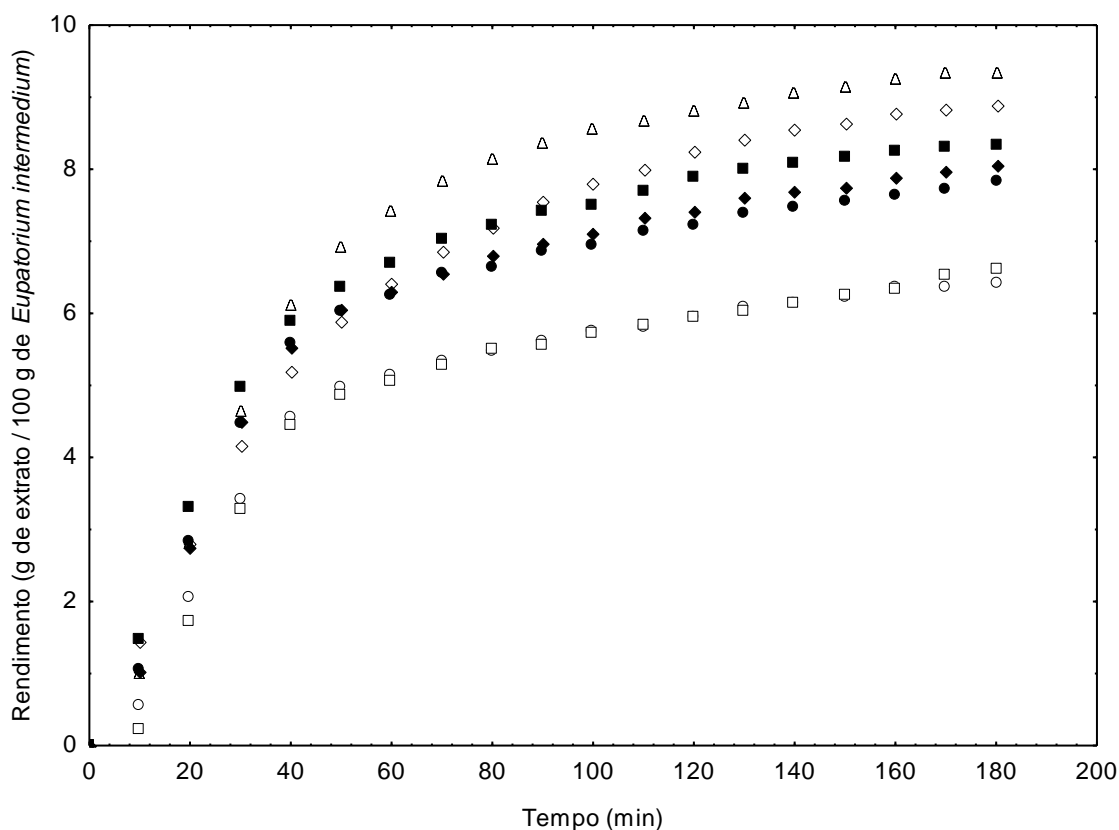


FIGURA 8 – CURVAS CINÉTICAS EXPERIMENTAIS PARA O PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE *E. intermedium* USANDO PROPANO COMPRIMIDO COMO SOLVENTE. (○) 30 BAR E 20 °C, (□) 100 BAR E 20 °C, (◇) 30 BAR E 60 °C E (△) 100 BAR E 60 °C. OS SÍMBOLOS PREENCHIDOS SÃO AS TRIPLICATAS DO PONTO CENTRAL (65 BAR E 40 °C).

A partir da FIGURA 8 pode-se observar que a maior taxa inicial de extração foi alcançada na condição cuja pressão foi de 65 bar e temperatura de 40 °C, contudo, após 40 minutos a maior taxa de extração passa a ser a da condição de 100 bar e 60 °C (ensaio 11), a qual se mantém como a mais alta até o final do processo. Também se pode verificar que, até 70 minutos de extração o segundo maior rendimento era do ensaio a 65 bar e 40 °C, após esse período o processo a 30 bar e 60 °C (ensaio 10) o ultrapassa e se torna o segundo maior rendimento. Como discutido anteriormente, a condição do ensaio 10 apesar de não apresentar o

maior rendimento e taxa de extração acaba sendo a mais eficiente, além de que, analisando as curvas de extração pode-se observar que, com relação ao rendimento final e taxa de extração inicial, não existe uma grande diferença entre o ensaio 10 e 11. E por fim, os rendimentos de extrato dos processos a 30 bar e 20 °C e 100 bar e 20 °C foram praticamente iguais durante os 180 minutos e foram os de menor eficiência com relação ao rendimento, comportamento que também demonstra a falta de significância da pressão no rendimento de extrato.

As curvas obtidas para extração com propano comprimido (FIGURA 8) também mostram o comportamento típico das curvas de extração utilizando fluido supercrítico, e diferentemente das obtidas utilizando CO₂, as três fases podem ser visualizadas, CER, FER e a etapa difusional.

A partir da análise da condição com maior rendimento e taxa de extração utilizando CO₂ supercrítico como solvente (250 bar e 80 °C), pode-se verificar que na primeira hora de extração o rendimento obtido foi 40,92 % do total atingido ao final do processo e na segunda hora foi 75,34 %. Quanto ao propano comprimido, considerando a condição de maior eficiência (30 bar e 60 °C) cerca de 72,25 % do rendimento total foi atingido ao final da primeira hora, enquanto cerca de 92,69 % foi obtido na segunda hora de extração. Novamente, pode-se concluir que o propano é mais eficiente para a obtenção de extratos de *E. intermedium*, uma vez que a extração com propano comprimido não só permitiu um maior rendimento, mas também uma maior taxa de extração.

5.5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS DE *Eupatorium intermedium*

A análise da composição da fração volátil dos extratos de *E. intermedium* obtidos com CO₂ supercrítico e propano comprimido e do óleo essencial encontra-se apresentada na TABELA 10, com o nome dos compostos, a composição relativa, o índice de retenção calculado e o índice de retenção da literatura segundo Adams (1995).

TABELA 10 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO VOLÁTIL DOS EXTRATOS DE FLORES DE *Eupatorium intermedium* OBTIDOS UTILIZANDOS CO₂ E PROPANO COMO SOLVENTES E DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDOS POR HIDRODESTILAÇÃO

Compostos	IR ^a	IR ^b	% Relativa									H ₂ O Hidrodestilação
			CO ₂ 30°C 150 bar	CO ₂ 30°C 250 bar	CO ₂ 80°C 250 bar	CO ₂ 55°C 200 bar ^c	Propano 20°C 30 bar	Propano 20°C 100 bar	Propano 60°C 30 bar	Propano 60°C 100 bar	Propano 40°C 65 bar ^c	
Butilacetato	810	812	0,61	-	-	-	0,47	-	-	-	-	-
Tricicleno	924	926	-	-	-	1,16 ± 0,06	-	-	-	-	-	1,43 ± 0,01
α-pineno	932	939	-	-	-	-	1,89	1,84	-	1,31	2,61 ± 0,03	22,62 ± 0,11
Sabineno	975	976	-	-	-	-	1,36	-	-	-	-	5,05 ± 0,02
β-pineno	981	980	-	-	-	-	-	1,35	-	1,06	1,84 ± 0,02	14,43 ± 0,05
β-myrceno	989	991	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,32 ± 0,01
δ-3-careno	1009	1011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,27 ± 0,00
Para-cymeno	1026	1026	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,45 ± 0,02
Limoneno	1030	1031	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,02 ± 0,03
(E)- β-ocimeno	1045	1050	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,70 ± 0,01
Campholenal	1129	1125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,27 ± 0,00
Trans-pinocarveol	1143	1139	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,21 ± 0,00
NI	1148	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,46 ± 0,00
Pinocarvone	1165	1162	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,57 ± 0,00
Terpinen-4-ol	1182	1177	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,66 ± 0,01
Myrtenol	1199	1194	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,78 ± 0,01
Verbone	1211	1204	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,42 ± 0,01
Cariofileno (E)	1416	1418	9,02	8,23	8,17	9,12 ± 0,09	13,14	13,00	12,43	11,09	15,28 ± 0,11	7,43 ± 0,02
Humuleno	1455	1454	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,42 ± 0,01
Germacreno D	1478	1480	9,43	7,20	7,42	8,81 ± 0,07	12,60	13,38	9,75	9,08	13,73 ± 0,10	4,56 ± 0,02
Biciclogermacreno	1493	1494	6,60	5,78	6,39	5,56 ± 0,03	7,69	7,34	7,00	4,61	8,03 ± 0,05	3,67 ± 0,02

Continua

TABELA 10 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO VOLÁTIL DOS EXTRATOS DE FLORES DE *Eupatorium intermedium* OBTIDOS UTILIZANDO CO₂ E PROPANO COMO SOLVENTES E DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDOS POR HIDRODESTILAÇÃO

Continuação e conclusão

Compostos	IR ^a	IR ^b	% Relativa									
			CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	Propano	Propano	Propano	Propano	Propano	H ₂ O
			30°C	30°C	80°C	55°C	20°C	20°C	60°C	60°C	40°C	Hidrodestilação
			150 bar	250 bar	250 bar	200 bar ^c	30 bar	100 bar	30 bar	100 bar	65 bar ^c	
δ-cadineno	1518	1524	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,38 ± 0,01
Germacreno B	1558	1556	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,42 ± 0,01
Espatulenol	1575	1576	48,4	50,02	54,16	45,80 ± 0,27	37,60	37,77	47,24	48,27	32,88 ± 0,15	11,07 ± 0,03
Oxido de cariofileno	1579	1581	18,26	14,53	14,86	14,20 ± 0,08	15,44	14,16	17,84	15,90	13,77 ± 0,01	6,66 ± 0,01
Carotol	1589	1594	5,46	5,71	5,83	4,92 ± 0,05	4,05	3,94	4,29	4,86	3,49 ± 0,02	1,46 ± 0,07
NI	1629	-	-	-	-	1,09 ± 0,08	-	0,84	-	-	0,64 ± 0,01	0,31 ± 0,01
α-cadinol	1651	1653	2,22	-	-	-	1,75	-	-	-	-	0,51 ± 0,01
NI	1656	-	-	1,70	-	1,50 ± 0,06	-	0,98	-	-	0,83 ± 0,03	-
NI	1694	-	-	2,76	2,55	2,63 ± 0,08	-	1,80	-	1,93	1,43 ± 0,03	-
NI	1734	-	-	2,28	-	2,02 ± 0,05	-	1,17	-	1,87	0,92 ± 0,01	-

IR, índice de retenção;

^a Índice de retenção calculado.^b Índice de retenção de Adams (1995).^c Valores médios e desvio padrão de ensaios em triplicata.* Não houve amostra suficiente para a quantificação dos constituintes químicos do extrato obtido com CO₂ supercrítico a 80 °C e 150 bar.

A análise cromatográfica demonstrou que o perfil químico da fração volátil dos extratos são similares. Alguns cromatogramas dos extratos são apresentados na FIGURA 9. Em todos os extratos os sesquiterpenos foram a classe mais abundante, com os derivados oxigenados predominantes. Os compostos principais foram três hidrocarbonetos sesquiterpênicos: cariofileno (E) (8 – 15 %), germacreno D (7 – 13 %), biciclogermacreno (4 – 8 %); e três sesquiterpenos oxigenados: espatulenol (32 – 54 %), óxido de cariofileno (14 – 18 %) e carotol (4 – 5 %). Contudo, uma pequena diferença foi observada, as extrações com CO₂ proporcionaram um quantidade maior do sesquiterpeno oxigenado espatulenol (45 – 54 %) que as extrações com propano comprimido (32-37 % e 47 a 48 %); por outro lado, a extração com propano comprimido proporcionou maiores quantidade dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos: cariofileno e germacreno D (11 – 15 %, 9 – 13 %, respectivamente), em relação a extração com CO₂ (8 – 9 % e 7 – 9 %, respectivamente).

Os extratos de *E. intermedium* também apresentaram outros compostos com alta polaridade que não podem ser identificados por cromatografia gasosa, devido a ausência de padrão na biblioteca e a baixa resolução cromatográfica nas condições analisadas. Portanto, métodos diferentes poderiam detectar outras substâncias não observadas pela análise realizada em cromatografia gasosa (MICHIELIN *et al.*, 2009).

Os compostos principais dos extratos (cariofileno (E), germacreno D, biciclogermacreno, espatulenol, óxido de cariofileno e carotol) não apresentaram qualquer tendência em relação a pressão e temperatura de operação da extração com propano comprimido, de acordo com o planejamento fatorial empregado.

Os principais compostos presentes no óleo essencial de *E. intermedium* foram os monoterpenos (62,67 %). Os sesquiterpeno representaram apenas 37,67 % do total de compostos identificados. Com relação aos monoterpenos, os predominantes foram quatro hidrocarbonetos: α -pineno (22,62 %), sabineno (5,05 %), β -pineno (14,43 %) e limoneno (7,02 %). Dentre os sesquiterpenos, os compostos majoritários foram dois hidrocarbonetos: cariofileno (E) (7,43 %) e germacreno D (4,56 %); e dois oxigenados: espatulenol (11,07 %) e óxido de cariofileno (6,66 %). Estes resultados podem ser visualizados a partir do perfil cromatográfico apresentado na FIGURA 10.

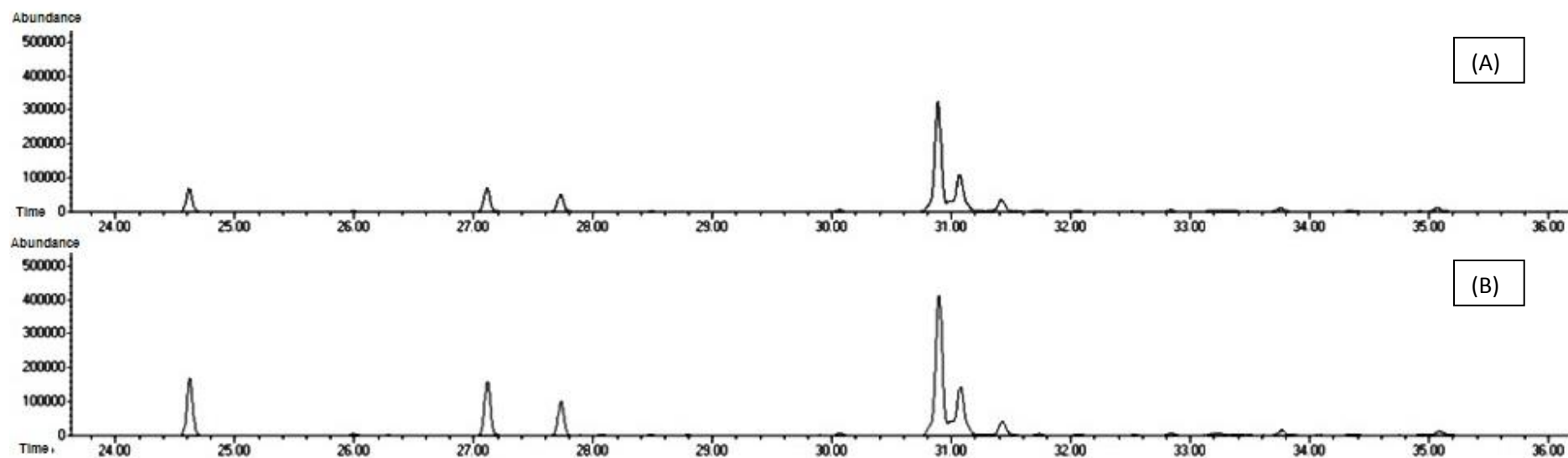


FIGURA 9 - CROMATOGRAMA DOS EXTRATOS DE FLORES *Eupatorium intermedium* OBTIDOS COM (A) CO₂ SUPERCRTICO A 150 BAR E 30 °C E (B) PROPANO COMPRIMIDO A 30 BAR E 20 °C.

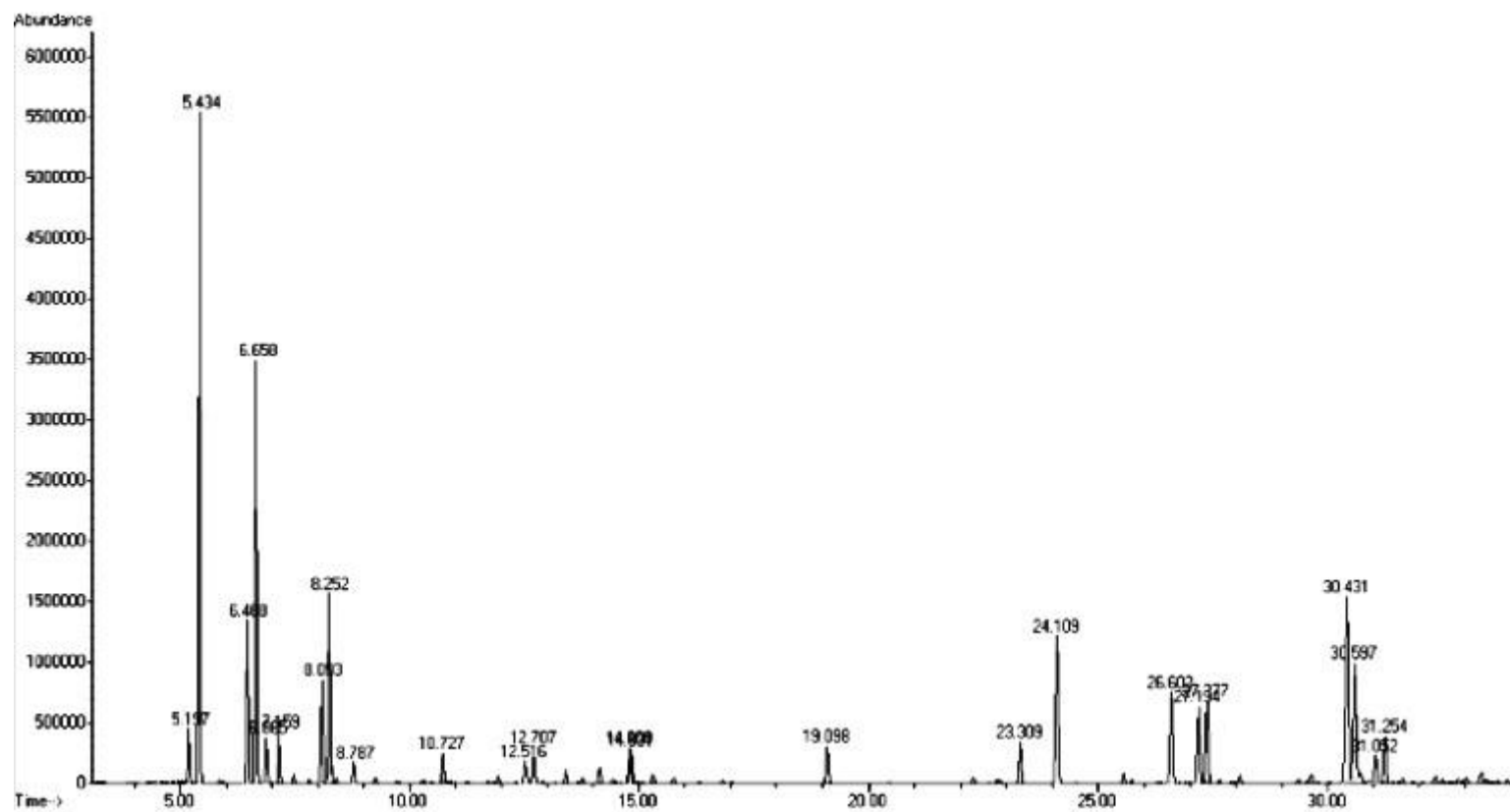


FIGURA 10 - CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eupatorium intermedium* OBTIDO POR HIDRODESTILAÇÃO

Souza (2007) verificou que os componentes principais do óleo essencial de *E. intermedium* obtido por hidrodestilação foram os monoterpenos α -pineno, β -pineno e limoneno, os sesquiterpeno β -cariofileno e biciclogermacreno e uma baixa concentração de compostos aromadendranos. E ainda, o estudo de Souza (2007) reportou a presença de outros compostos, não identificados nos extratos supercríticos e também no óleo essencial. Estas diferenças podem ser associadas com o método de extração e o quimiotipo da planta. De acordo com a ANVISA (2005) o termo quimiotipo é aplicado a planta que diferem de outras da mesma espécie devido a sua diferente composição química.

Pode-se verificar uma grande diferença em relação a composição química dos extratos obtidos com CO₂ supercrítico e propano comprimido, quando comparados com o óleo essencial obtido por hidrodestilação. A primeira grande diferença é praticamente a ausência dos monoterpenos nos extratos, os quais, de acordo com Díaz-Maroto et al. (2002), podem ter sido perdidos durante a despressurização na saída do extrator. Outra distinção dos extratos com relação ao óleo essencial é que no primeiro obteve-se uma maior porcentagem de compostos oxigenados, enquanto no segundo foi verificado uma maior quantidade de hidrocarbonetos. O mesmo comportamento foi verificado por Reverchon e Senatore (1992). Além de que, existe uma grande variação em número de compostos identificados, 16 nos extratos e 27 no óleo essencial, sendo que o composto encontrado em maior quantidade nos extratos foi o espatulenol, enquanto que no óleo essencial foi α -pineno.

A partir da composição química apresentada na TABELA 10, pode-se verificar que os extratos e o óleo essencial de *E. intermedium* apresentam um grande número de compostos importantes, os quais apresentam atividade biológica e podem ser aplicados em alimentos, produtos químicos e farmacêuticos. Além apresentarem alto valor agregado e de mercado.

Diversas atividades biológicas têm sido associadas aos pinenos, incluindo ação repelente de insetos, anti-inflamatória e antimicrobiana (Russo, 2011; Nissen et al., 2010; Silva et al., 2012; Martins et al., 1993).

Sabineno, um hidrocarboneto bicíclico, é um dos compostos químicos relacionados com a característica de tempero de alguns extratos (Fornari et al., 2012). Além disso, de acordo com Rashid et al. (2013), este monoterpeno apresenta atividade antibacteriana.

O limoneno, um dos terpenos mais comuns na natureza, pode ser encontrado em alimentos e aplicado na indústria de fragrâncias, como um solvente e na fabricação de polímeros e adesivos (Sun, 2007; Thomas; Bessière, 1989). Além disso, de acordo com Sun (2007), o limoneno pode ser usado para dissolver cálculos biliares, no alívio da azia e doenças gastroesofágicas, além de apresentar atividade quimioprotetora contra vários tipos de câncer. Existe também um mercado com grande potencial para derivados oxigenados do limoneno, os quais são importantes compostos aromáticos e medicinais de alto valor agregado (Duetz *et al.*, 2003.;Wagner; Elmadfa, 2003). A forma hidrogenada do limoneno pode ser ainda utilizada como agente de mistura no diesel para melhorar o desempenho e, ainda, apresenta propriedades favoráveis para uso como biocombustível (Tracy *et al.*, 2009; Allonso-Gutierrez *et al.*, 2013).

A alta proporção de espatulenol encontrada nos extratos de *E. intermedium* indica que estes podem ser excelente fonte dessa substância. Este sesquiterpeno tem o cheiro de madeira seca, e pode ser usado em composições aromatizantes de alimentos e em perfumes sofisticados. Aplicações cobertas por patentes incluem seu uso em alimentos, medicamentos, pastas de dentes, sabonetes, detergentes, agentes de limpeza e outros produtos domésticos, cosméticos e preparações para tratamento de pele (MENDES *et al.*, 2008). Por outro lado, esta substância apresenta importantes propriedades biológicas, Cantrell *et al.* (2005) demonstrou que o espatulenol isolado de espécies de *Callicarpa* apresentaram significativa atividade repelente contra *Aedes aegypti* e *A. stephensi*. Além de que, como reportado na literatura o espatulenol apresenta propriedades antibacterianas (ULUBELEN *et al.*, 1994).

O óxido de cariofileno, composto encontrado com a segunda maior proporção nos extratos, atua diretamente na inibição de fungos e apresenta propriedades antibacterianas (CANTRELL *et al.*, 2005; VEIGA Jr; PINTO, 2002). O sesquiterpeno cariofileno apresenta atividade anticarcinogênicas e anti-inflamatórias (HENG *et al.*, 1992).

5.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A TABELA 11 apresenta os resultados referentes à atividade antioxidante de acordo com as análises do conteúdo de fenólicos totais, DPPH e método de redução do complexo fosfomolibdênio. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão, dos extratos de *E. intermedium* obtidos sob diferentes condições de pressão e temperatura, usando CO₂ supercrítico e propano comprimido como solventes, e do óleo essencial obtido por hidrodestilação. Os resultados foram analisados estatisticamente e cada resposta foi avaliada independentemente. O teste de Tukey foi utilizado para avaliar as diferenças entre as médias considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

5.6.1 Conteúdo de fenólicos totais

O maior conteúdo de FT na extração com CO₂ supercrítico foi obtido no processo realizado na temperatura e pressão mais elevadas (80 °C e 250 bar) (8,74 mg GAE/ g de extrato). Para as extrações realizadas utilizando propano comprimido como solvente, o valor mais elevado de FT foi 10,03 mg GAE/ g de extrato, na condição de maior temperatura (20 °C) e maior pressão (100 bar). Ambos os valores diferiram significativamente entre si e dos outros valores ($p < 0,05$), demonstrando que a extração com propano comprimido, na referida condição de pressão e temperatura, possibilitou a extração da maior quantidade de compostos fenólicos.

Não foi possível avaliar o efeito da pressão e temperatura sobre o conteúdo de FT extraído usando CO₂ como solvente devido a falta de extrato obtido a 150 bar e 80 °C. Por outro lado, para o propano foi observado que a pressão apresentou efeito positivo e significativo na concentração dos compostos fenólicos, enquanto a temperatura não apresentou efeito significativo, com o planejamento experimental empregado.

TABELA 11 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE *Eupatorium intermedium* OBTIDOS USANDO CO₂ SUPERCRÍTICO E PROPANO COMPRIMIDO COMO SOLVENTE E DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO POR HIDRODESTILAÇÃO

Condições de extração	FT** (mg GAE/ g _{ext})	EC ₅₀ *** (µg/mL)	% AA**** (3500 µg/mL)	AA***** (mg α-tocoferol/g _{ext})
CO ₂ /30°C/150 bar	4,82 ^g (±0,17)	5231,24 ^a (±19,78)	36,55 ^a (±0,16)	293,47 ^b (±6,86)
CO ₂ /30°C/250 bar	6,41 ^e (±0,13)	6720,55 ^e (± 35,87)	18,49 ^f (±0,28)	281,13 ^b (±8,34)
CO ₂ /80°C/150 bar	*	*	*	*
CO ₂ /80°C/250 bar	8,74 ^b (±0,24)	5824,89 ^c (±30,10)	26,62 ^d (±0,27)	284,33 ^b (±15,11)
CO ₂ /55°C/200 bar	7,54 ^d (±0,07)	6558,28 ^d (±31,41)	26,99 ^d (±0,11)	255,53 ^{bc} (±8,38)
Propano/20°C/30 bar	5,69 ^f (±0,07)	9014,30 ^g (±18,40)	16,35 ^g (±0,11)	214,85 ^c (±16,76)
Propano/20°C/100 bar	10,03 ^a (±0,13)	7951,63 ^f (±16,65)	22,99 ^e (±0,11)	266,96 ^b (±30,86)
Propano/ 60°C/ 30 bar	6,60 ^e (±0,07)	5507,47 ^b (±34,32)	34,18 ^b (±0,44)	294,39 ^b (±20,63)
Propano/ 60°C/ 100 bar	8,10 ^c (±0,07)	5508,71 ^b (±20,62)	29,38 ^c (±0,23)	257,82 ^{bc} (±7,04)
Propano/ 40°C/ 65 bar	7,80 ^{cd} (±0,30)	5277,23 ^a (±26,27)	34,82 ^b (±0,34)	268,33 ^b (±7,04)
Hidrodestilado	4,26 ^h (±0,24)	>10000,00 ^h	10,21 ^h (±0,22)	1154,69 ^a (±10,88)

* Não havia extrato suficiente para quantificação da atividade antioxidante e compostos fenólicos.

** Conteúdo fenólico total.

*** Inibição da concentração de DPPH a 50 %.

**** Atividade antioxidante avaliada pelo sequestro de radicais DPPH.

***** Atividade antioxidante avaliada pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio.

Valores com a mesma letra ao longo da mesma coluna não são significativamente diferentes (p<0,05).

No geral, o conteúdo de FT foi baixo quando comparado com outros extratos supercríticos, tais como o extrato de bagaço de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) estudado por Benelli *et al.* (2010), o qual variou de 9 a 36 mg GAE/ g de extrato para as extrações com CO₂ supercrítico. Outros exemplos que podem ser mencionados são do extrato de folhas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) avaliado por Martinez-Correa *et al.* (2011), no qual o conteúdo de FT foi de 51 mg GAE/ g de extrato para a extração a 60 °C e 400 bar, e dos extratos de *Cordia verbanacea* DC estudados por Michielin *et al.* (2011), os quais variaram de 46 a 112 mg GAE/ g de extrato.

O menor conteúdo de FT foi obtido na hidrodestilação (4,26 mg GAE/ g de extrato), o qual diferiu significativamente de todos os outros extratos ($p < 0,05$). De acordo com Pinelo *et al.* (2006), a melhor temperatura para extração de compostos fenólicos é 50 °C devido a sua sensibilidade térmica. E ainda, algumas substância com atividade antioxidante, tais como compostos polifenólicos, normalmente apresentam massa molecular elevada e baixa volatilidade, enquanto o método de hidrodestilação é mais adequado para extração de compostos voláteis (MICHIELIN *et al.*, 2011).

5.6.2 Método DPPH

Os resultados apresentados na TABELA 11 mostram que, para os extratos diluídos na concentração de 3500 mg/ mL, a maior atividade antioxidante foi de 36,55 %, obtida na extração com CO₂ na condição de menor temperatura e pressão (30 °C e 150 bar), a qual diferiu significativamente de todas as demais ($p < 0,05$). Para extração com propano, a maior atividade antioxidante foi de 34,82 %, na condição de pressão e temperatura intermediárias, 40 °C e 65 bar, contudo, esta não diferiu significativamente da atividade antioxidante do extrato obtido a temperatura mais elevada (60 °C) e pressão mais baixa (30 bar). O hidrodestilado apresentou a menor atividade antioxidante (10,21 %), a qual diferiu significativamente de todos os outros extratos ($p < 0,05$).

A atividade antioxidante, avaliada pelo método DPPH, dos extratos de *E. intermedium* pode ser considerada baixa e este resultado pode ser atribuído, possivelmente, a polaridade dos solventes utilizados, o que resulta

preferencialmente na extração de compostos apolares, tais como resinas, pigmentos, entre outros, os quais tem baixa atividade antioxidante (MENSOR *et al.*, 2001). Silva *et al.* (2000) reportaram os efeitos significativos de eliminação de radicais livres DPPH por compostos fenólicos. Assim, a baixa concentração de compostos fenólicos nos extratos e no óleo de *E. intermedium* também pode ser a responsável pela baixa atividade antioxidante verificada no método DPPH. Além de que, este método restringe-se somente à habilidade dos compostos presentes nos extratos e no óleo essencial de doar hidrogênios ou de doar elétrons. Assim, os baixos valores de atividade antioxidante obtidos por este método podem ter sido causados, ainda, por alguns fatores como: a inexistência de substâncias doadoras de hidrogênio ou de elétrons nos extratos e no óleo volátil desta planta; a presença de uma grande variedade de compostos que interagem com o meio contendo radicais DPPH e entre si, sendo que estas substâncias podem ser capazes de doar hidrogênio ou elétrons quando puras, uma vez que, em sistemas complexos o estado de excitação das moléculas interfere diretamente na capacidade antioxidante; ou ainda a presença de compostos de alta massa molecular e forma estrutural complexa, os quais podem apresentar dificuldade de reagir com o radical DPPH devido ao impedimento estérico, o que lhes confere uma alta estabilidade (SILVA, 2008). No caso do óleo essencial, pode ter ocorrido, ainda, uma possível degradação térmica dos compostos responsáveis pela atividade antioxidante detectados pelo método DPPH, uma vez que a hidrodestilação é realizada a temperatura de ebulição da água (BASER; BUCHBAUER, 2010).

De acordo com o planejamento fatorial empregado não foi verificado qualquer tendência da atividade antioxidante dos extratos, obtidos com propano comprimido, em relação a pressão e temperatura. Esse comportamento aleatório pode ser associado as diferentes proporções dos compostos extraídos em cada uma das condições experimentais, refletindo em variações no potencial antioxidante (BENELLI *et al.*, 2010).

Os resultados apresentados na TABELA 11, mostram que os menores valores de EC₅₀ foram obtidos nos ensaios a 30 °C e 150 bar (5231,24 µg/mL), usando CO₂ supercrítico como solvente, e 40 °C e 65 bar (5277,23 µg/mL), utilizando propano comprimido como solvente, uma vez que ambos não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). Portanto, podemos dizer que os extratos de *E. intermedium* obtidos por extração supercrítica apresentaram valores de EC₅₀ acima do que é

considerado bom para um antioxidante potencial, o qual é aproximadamente 250 µg/mL (CAMPOS *et al.*, 2008). Tal comportamento é muito comum para diversos extratos supercríticos (BENELLI *et al.*, 2010; MARTINEZ-CORREA *et al.*, 2011; CAMPOS *et al.*, 2008; GARMUS *et al.*, 2014).

5.6.3 Método de redução do complexo fosfomolibdênio

A partir da TABELA 11 pode-se observar que a maior atividade antioxidante dos extratos de *E. intermedium* foi 294,39 mg α -tocoferol/g de extrato no ensaio realizado a temperatura mais elevada (60 °C) e pressão mais baixa (30 bar), utilizando propano comprimido como solvente. Contudo, esta diferiu significativamente apenas do ensaio a 20 °C e mesma pressão, realizado com o mesmo solvente. Vale ressaltar que os extratos apresentaram atividade antioxidante quando avaliados pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio, enquanto que isso não aconteceu no teste anterior com o DPPH.

Além de que, diferente do que foi verificado no método DPPH, a atividade antioxidante do hidrodestilado, avaliada pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio, foi muito maior que dos extratos obtidos com CO₂ supercrítico e propano comprimido (1.154,69 mg α -tocoferol/ g de extrato), a qual diferiu significativamente de todos os outros extratos. Deve-se enfatizar que os compostos antioxidantes detectados em cada um dos métodos pode não ser necessariamente o mesmo que de outro, uma vez que os extratos e óleos essenciais são misturas de compostos que podem apresentar interações antagonistas ou sinergistas (MARTINEZ-CORREA *et al.*, 2011). A atividade antioxidante do óleo essencial de *E. intermedium* foi mais elevada que dos extratos de gengibre, obtido no trabalho de Mesomo e colaboradores (2012), utilizando CO₂ supercrítico e propano comprimido como solvente, no qual os resultados variaram de 484,4 a 931,67 mg α -tocoferol/ g de extrato.

De acordo com o planejamento fatorial empregado verificou-se que a temperatura e a interação entre a temperatura e a pressão tiveram efeitos significativos sobre a atividade antioxidante, avaliada pelo método de redução do

complexo fosfomolibdênio, sendo a primeira positiva sobre a função resposta e a segunda negativa.

5.7 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

As atividades antibacterianas do óleo essencial e dos extratos de *E. intermedium* são apresentados na TABELA 12, em termos de diâmetro da zona de inibição (mm) para os micro-organismos testados. Tais resultados indicam que diferentes espécies de bactérias exibem diferentes níveis de sensibilidade frente ao óleo e extratos testados.

TABELA 12 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATOS DE *Eupatorium intermedium*, OBTIDOS UTILIZANDO CO₂ SUPERCRÍTICO E PROPANO COMPRIMIDO COMO SOLVENTE

Condições de extração	Diâmetro da zona de inibição* (mm)**	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
CO ₂ /30 °C/150 bar	21,18 ^{ab} (± 0,43)	13,86 ^b (± 0,24)
CO ₂ /30 °C/250 bar	20,78 ^b (± 0,64)	14,12 ^b (± 0,20)
CO ₂ /80 °C/150 bar	***	***
CO ₂ /80 °C/250 bar	20,12 ^b (± 0,35)	13,85 ^b (± 0,69)
CO ₂ /55 °C/200 bar	22,53 ^a (± 0,28)	16,33 ^a (± 0,85)
Propano/ 20 °C/30 bar	11,87 ^d (± 0,35)	10,24 ^c (± 0,05)
Propano/ 20 °C/100 bar	11,63 ^d (± 0,21)	10,59 ^c (± 0,19)
Propano/60 °C/30 bar	12,78 ^{cd} (± 0,27)	10,29 ^c (± 0,27)
Propano/60 °C/100 bar	14,09 ^c (± 0,20)	10,58 ^c (± 0,16)
Propano/40 °C/65 bar	12,07 ^d (± 0,41)	10,57 ^c (± 0,23)
Hidrodestilado	13,07 ^{cd} (± 1,26)	11,09 ^c (± 0,73)

* Diâmetro do poço incluído.

** Valor médio e desvio padrão de ensaios realizados em triplicata. Valores com a mesma letra ao longo da mesma coluna não são significativamente diferentes (p<0,05).

*** Não havia extrato suficiente para quantificação da atividade antibacteriana

As bactérias Gram-negativas testadas, *E. coli* e *S. Typhimurium*, foram completamente resistentes ao óleo essencial e todos os extratos testados. Enquanto, as bactérias Gram-positivas testadas, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, foram suscetíveis aos mesmos. Michielin *et al.* (2009), Mesomo *et al.* (2013) e Kitzberger *et al.* (2007) quando avaliaram extratos de outras matérias primas detectaram o mesmo comportamento. A alta resistência de bactérias Gram-negativas pode ser devido a complexidade da parede celular deste grupo de micro-organismos, os quais tem uma membrana externa que dota a superfície da bactéria com forte hidrofiliidade e restringe a difusão de compostos hidrofóbico através de sua camada de lipopolissacarídeo (NIKAIDO; VAARA, 1985; VAARA, 1992).

Os extratos obtidos com CO₂ supercrítico apresentaram maior zona de inibição quando comparados com os extratos obtidos com propano comprimido e também ao óleo essencial. O extrato mais efetivo foi obtido nas condições de pressão e temperatura intermediarias, 55°C e 200 bar, com zona de inibição de 22,53 mm e 16,33 mm, para *S. aureus* e *L. monocytogenes*, respectivamente. O primeiro, contudo, não diferiu significativamente ($p < 0,05$) do extrato obtido na condição de menor temperatura e pressão (30°C e 150 bar), enquanto o segundo foi estatisticamente diferente de todos os outros extratos ($p < 0,05$). Pode-se verificar também a partir da Tabela 10 que a atividade antibacteriana do hidrodestilado não diferiu significativamente ($p < 0,05$) da maioria dos extratos obtidos utilizando propano comprimido como solvente, para *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

Não foi verificada qualquer tendência da atividade antimicrobiana com relação a pressão e a temperatura para os extratos obtidos utilizando CO₂ supercrítico como solvente para ambos os micro-organismos. O mesmo foi verificado para os extratos obtidos utilizando propano comprimido frente a *L. monocytogenes*. Contudo, a temperatura apresentou efeito positivo sobre a atividade antimicrobiana dos extratos obtidos com propano comprimido frente à *S. aureus*.

5.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados apresentados nesse capítulo, verificou-se que as flores de *E. intermedium* proporcionam a obtenção de elevados rendimentos de extratos

por extração supercrítica, principalmente quando comparado com o processo de hidrodestilação. O maior rendimento de extrato obtido utilizando CO₂ supercrítico foi na pressão de 250 bar e 80 °C (5,85 %). Para o propano o maior rendimento foi 9,41 %, obtido a 100 bar e 60 °C.

Com relação ao efeito das variáveis do processo, para o CO₂, não foi possível avaliar o efeito da pressão e temperatura no rendimento da extração, com o planejamento experimental empregado, pois, na pressão de 250 bar a elevação da temperatura aumentou o rendimento, já a 150 bar o mesmo ocasionou uma diminuição no rendimento. Dessa forma, a falta de ajuste foi significativa e obteve-se um baixo valor de R², evidenciando que existe uma curvatura na região de exploração e seria necessário a introdução de pontos axiais, para avaliar o efeito das variáveis sobre o rendimento. No caso do propano observou-se que somente a temperatura apresentou um efeito significativo e positivo no rendimento e, considerando que quanto menor a pressão menor é o custo de operação, pode-se estabelecer que a condição mais favorável energeticamente é a pressão de 30 bar e temperatura de 60 °C, que possibilitou um rendimento de 8,91 %.

O estudo das curvas de extração possibilitou confirmar que as extrações realizadas neste trabalho apresentaram o comportamento típico dos processos de extração supercrítica. Além disso, foi possível verificar que a maior taxa de extração, utilizando CO₂, foi na condição de 250 bar e 80 °C durante todo o período de extração. Para o propano, a taxa inicial de extração foi maior na condição cuja pressão foi de 65 bar e temperatura de 40 °C, contudo, após 40 minutos a maior taxa de extração passa a ser a da condição de 100 bar e 60°C. As curvas de extração permitiram observar ainda que, a extração com propano comprimido não só permitiu um maior rendimento, mas também uma maior taxa de extração, uma vez que, nas condições de maior rendimento, ao final da primeira hora, obteve-se 40,92 % e 72,25 % do rendimento total atingido ao final do processo, para a extração com CO₂ e propano, respectivamente.

Outra consideração relevante em relação aos resultados obtidos nesse trabalho é referente à composição química dos extratos e do óleo essencial obtidos, nos quais evidenciou-se a presença de grande número de compostos de alto valor agregado e que apresentam atividade biológica. O perfil cromatográfico foi similar em todos os extratos, foram encontrados como majoritário apenas sesquiterpênos: cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno, espatulenol, óxido de cariofileno e

carotol. O perfil cromatográfico do óleo essencial foi bastante distinto dos extratos, os compostos mais abundantes foram α -pineno, sabineno, β -pineno, limoneno, cariofileno (E), germacreno D, espatulenol e óxido de cariofileno, ou seja, os monoterpenos apresentam grande relevância nesse caso. Além disso, existe uma grande variação em número de compostos identificados, sendo 16 nos extratos e 27 no óleo essencial.

Com relação ao conteúdo de fenólicos totais, foi verificado que a extração com propano comprimido a 20 °C e 100 bar proporcionou a extração da maior quantidade (10,03 mg GAE/ g de extrato). O menor conteúdo de fenólicos totais foi obtido na hidrodestilação (4,26 mg GAE/ g de extrato). Ambos os valores foram baixos quando comparados com outros extratos e óleos essenciais encontrados na literatura. A atividade antioxidante dos extratos de *E. intermedium*, no geral, foram baixas. No método DPPH, pode-se observar praticamente a ausência de atividade antioxidante, tanto para os extratos quanto para o óleo essencial, devido ao elevado valor de EC₅₀. Pode-se correlacionar a baixa concentração de fenólicos totais com a baixa atividade antioxidante frente radicais DPPH. Por outro lado, os extratos supercríticos apresentaram atividade antioxidante frente ao método de redução do complexo fosfomolibdênio. E, ainda, o óleo essencial apresentou elevada atividade antioxidante (1154,69 mg α -tocoferol/g de óleo), quando avaliada por esse método.

E por fim, no teste de atividade antibacteriana verificou-se que as bactérias Gram-negativas testadas, *E. coli* e *S. Typhimurium*, foram completamente resistentes ao óleo essencial e todos os extratos testados. Enquanto, as bactérias Gram-positivas testadas, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, foram suscetíveis aos mesmos. Os extratos obtidos com CO₂ supercrítico apresentaram maior zona de inibição, sendo o mais efetivo obtido a 55 °C e 200 bar, com zona de inibição de 22,53 mm e 16,33 mm, para *S. aureus* e *L. monocytogenes*, respectivamente.

Diante do exposto pode-se salientar que o propano é um solvente mais adequado para a obtenção de extratos de *E. intermedium* do que o CO₂, com relação ao maior rendimento, taxa de extração mais elevada e condições mais brandas de operação. E ainda, a análise do ponto de vista econômico, demonstra que o propano, apesar de ser mais caro, acabada sendo mais atrativo, uma vez que proporciona a obtenção de maiores rendimento, em um tempo menor, ou seja, com consumo reduzido de solvente e a pressões mais brandas, quando comparado ao CO₂. Assim, a extração com propano poderia ser bastante interessante visando a

obtenção de extratos para separação de compostos com atividade biológica ou outras aplicações. Contudo, a extração com CO₂ possibilitou a obtenção de extratos com maior atividade antibacteriana quando comparado com o propano, assim, para esta finalidade é mais apropriado a utilização de CO₂ supercrítico. E por fim, a hidrodestilação apresentou maior potencial em questão da obtenção de extratos com atividade antioxidante, visto que de acordo com o método de redução do complexo fosfomolibdênio, o óleo essencial apresentou elevada atividade quando comparado aos extratos obtidos com CO₂ e propano.

6 CONCLUSÕES

Este trabalho demonstrou que elevados rendimentos de extratos de *E. intermedium* podem ser obtidos utilizando CO₂ supercrítico e propano comprimido como solvente. Os maiores rendimentos de extratos foram 58,5 g de extrato / kg de flores e 93,4 g de extrato / kg de flores, utilizando CO₂ supercrítico a 80 °C e 250 bar, e propano comprimido a 60 °C e 100 bar, respectivamente. A extração com solvente orgânico possibilitou um rendimento de 94,1 g de extrato / kg de flores. Já a hidrodestilação apenas 10,10 g de extrato / kg de flores. Assim, os resultados demonstraram que o propano é um solvente adequado e promissor para a obtenção de extratos de flores *E. Intermedium*, em função do rendimento elevado, praticamente igual ao obtido com solvente orgânico, e de menores pressões requeridas, quando comparados com as extrações com CO₂ supercrítico.

Para a extração com CO₂ supercrítico, não foi possível avaliar o efeito das variáveis, pressão e temperatura, no rendimento da extração, com o planejamento experimental proposto. Com relação ao propano comprimido, observou-se que somente a temperatura apresentou um efeito significativo e positivo no rendimento.

Os extratos obtidos com CO₂ supercrítico e propano comprimido apresentaram composição química semelhante. As substâncias mais abundantes foram os sesquiterpenos espatulenol, óxido de cariofileno, cariofileno (E), germacreno D, biciclogermacreno e carotol. As variáveis do processo (temperatura e pressão) não apresentaram qualquer tendência em relação a quantidade dos compostos majoritários no extrato para ambos os solventes (CO₂ supercrítico e propano comprimido). Para o óleo essencial obtido por hidrodestilação, os compostos principais foram semelhantes aos compostos encontrados nos extratos supercríticos, porém, diversos monoterpenos também foram identificados. Os compostos mais abundantes no óleo essencial foram α -pineno, sabineno, β -pineno, limoneno, cariofileno (E), germacreno D, espatulenol e óxido de cariofileno.

A atividade antioxidante, determinada pelo método de DPPH, tanto dos extratos quanto no óleo essencial foi baixa, visto que o EC₅₀ foi muito maior do que o considerado adequado para um antioxidante em potencial, o qual é aproximadamente 250 μ g/mL. Contudo, o óleo essencial apresentou elevada atividade antioxidante (1154,69 mg α -tocoferol/g de óleo), quando avaliada pelo

método de redução do complexo fosfomolibdênio. O maior conteúdo de fenólicos totais (10,03 mg GAE/ g de extrato) foi obtido no extrato usando propano comprimido a 20 °C e 100 bar.

Os extratos e o óleo essencial foram eficazes contra as bactérias Gram-positivas, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, com atenção especial ao extrato obtido com CO₂ supercrítico a 80 °C e 250 bar. As bactérias Gram-negativas testadas, *S. typhimurium* e *E. coli*, foram completamente resistentes aos extratos e óleo essencial testados.

De uma maneira geral, o estudo da obtenção de extratos de flores de *E. intermedium*, utilizando CO₂ supercrítico e propano comprimido como solvente e, ainda, o óleo essencial obtido por meio de hidrodestilação, demonstrou que esta planta tem potencial para utilização no desenvolvimento de diversos bioprodutos, devido ao alto rendimento de extrato, composto identificados, atividade antioxidante e antimicrobiana verificados.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar a modelagem matemática da cinética de extração supercrítica e com fluido pressurizado de extratos de flores de *E. intermedium*.
- Avaliar o efeito de diferentes tamanhos de partículas no rendimento e características dos extratos.
- Quantificar a atividade antioxidante pelo método do β -caroteno, que de acordo com a literatura se configura como um método bastante adequado para avaliar o potencial antioxidante de extratos constituídos na grande maioria por compostos apolares.
- Quantificar a atividade antimicrobiana dos extratos frente a fungos.
- Determinar a concentração mínima inibitória dos extratos de flores de *E. intermedium*.
- Avaliar a composição química e o potencial biológico de extratos de *E. intermedium* obtidos com CO₂ supercrítico a menores pressões, variando de 80 a 100 bar.
- Estudar a adição de co-solventes no processo de obtenção de extratos de *E. intermedium*.

REFERÊNCIAS

ABAROUDI, K.; TRABELSI, F.; CALLOUD-GABRIEL, B.; RECANSENS, F. Mass transport enhancement in modified supercritical fluid. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 38, 3505-3518, 1999.

ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. **Allured Publishing Corporation**: Carol Stream, Illinois, USA 1995, pp. 469.

ALBUQUERQUE, M.R.J.R.; SILVEIRA, E.R.; UCHOOA, D.E.de A.; LEMOS, T.L.G.; SOUZA, E.B.; SANTIAGO, G.M.P.; PESSOA, O.D.L. Chemical Composition and Larvicidal Activity of the Essential Oils from *Eupatorium betonicaeforme* (D.C.) Baker (Asteraceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.6708-6711, 2004.

Allonso-Gutierrez, J.; Chan, R.; Batth, T.S.; Adams, P.D.; Keasling, J.D.; Petzold, C.J.; Lee, T.S. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for limonene and perillyl alcohol production. **Metabolic Engineering**, v. 19, p. 33–41, 2013.

ALMEIDA, O.P. Tratamento da doença de alzheimer: avaliação crítica sobre o uso de anticolinesterásicos. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v.56, n.3-B, p.688-696, 1998.

ANDRADE, K.S.; GONÇALVES, R.T.; MARASCHIN, M.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S.R.S. Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. **Talanta**, v.88, p. 544– 552, 2012.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; McDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, 127, 183–198, 2002. A.O.A.C. Official Methods of Agricultural Chemists. 16th Ed. Washington, 1995.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº98, de 26 de dezembro de 2005. D.O.U. de 27/12/2005.

AOAC. Official Methods of Analysis. **Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, 1999.

AOCS, American Oil Chemists Society. **Official methods and recommended practices**. Champaign, 1994.

ARAÚJO, M. E.; MACHADO, N. T.; FRANÇA, L. F.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical extraction of pupunha (*Guilielma speciosa*) oil in a fixed bed using carbon dioxide. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v.17, n.3, 2000.

ARBOS, K. A.; VILLAS-BOAS, L. B.; SANTOS, C. A. M.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Influência de diferentes técnicas de cultivo sobre o potencial antioxidante de crucíferas. **Alimentos e Nutrição**, v.15, n.1, p.55-61, 2004.

BALASUNDRAM, N.; SAUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v.99, p.191–203, 2006.

BASER, K.H.C.; BUCHBAUER, G. 2010. **Handbook of essencial oils: science, technology and applications**. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/61792728/Handbook-of-Essential-Oils-Science-Technology-and-Applications>>. Acesso em: 11/05/2013.

BAUER, A. W., KIRBY, W. M. M., SHERRIS, J. C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1996.

BENELLI, P.; RIEHL, C.A.S.; SMÂNIA JR., A.; SMÂNIA, E.F.A.; FERREIRA, S.R.S. Biactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: Mathematical modeling and extract composition. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p. 132-141, 2010.

BRACK P, SINGER RF, CASAGRANDE A, PEDROLLO CT, MILANESI LS, GRINGS M, PANIZZI R, TALBOT V. 2009. **Levantamento preliminar da flora e da vegetação do vale do rio Pelotas, no município de Bom Jesus, RS, e a importância de sua conservação**. INGA Estudo Ambientais. Disponível em: <<http://migre.me/xHPc>>. Acesso em: 20/03/2012.

BRASIL. Decreto nº. 50.040, de 24 de janeiro de 1961. Normas Técnicas Especiais Reguladoras do emprego de aditivos químicos a alimentos. **Agência Nacional de Viginlância Sanitária**, 1961.

BRASIL. Resolução nº. 104, de 26 de abril de 1999. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 1999.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v.56, p.317–333, 1998.

BRUM, L.F.W. **Obtenção e avaliação de extratos de folhas de eucalipto (*eucalyptus dives*) como potenciais antioxidantes em alimentos**. 135 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

BRUNNER, G. Gas extraction: an Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes. 1 ed. **Darmstadt, Alemanha: Steinkopff**, 387p, 1994.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v.67, p.21–33, 2005.

BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, p. 2774-2779, 2001.

BURNS, J.; GARDNER, P. T.; MATTHEWS, D.; DUTHIE, G. G.; LEAN, M. E. J.; CROZIER, A. Extraction of Phenolics and Changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.5797–5898, 2001.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p.223– 253, 2004.

CAMPOMANES, A.M.F. **Recuperação de compostos bioativos via extração supercrítica convencional dos resíduos de uva provenientes do processamento do pisco**. 224 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

CAMPOS, L.M.A.S. DE; LEIMANN, F.V.; PEDROSA, R.C.; FERREIRA, S.R.S. Free radical scavenging of grape pomace extracts from cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8413–8421, 2008.

CANTRELL, C. L.; KLUN, J. A.; BRYSON, C. T.; KOBALSY, M.; DUKE, S. O. Isolation and identification of mosquito bite deterrent terpenoids from leaves of American (*Callicarpa americana*) and Japanese (*Callicarpa japonica*) beautyberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5948-5953, 2005.

CARDOSO, C. A. L.; SILVA, J. R. M.; KATAOKA, V. M. F.; BRUM, C. S.; POPPI, N. R. Avaliação da atividade antioxidante, toxicidade e composição química por CG-EM do extrato hexânico das folhas de *Campomanesia pubescens*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 3, p. 297-301, 2008.

CARERI, M.; FURLATTINI, L.; MANGIA, A.; MUSCI, M.; ANKLAM, E.; TREOBALD, A.; von HOLST, C. Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina Pacifica* algae: a chemometric approach. **Journal of Chromatography A**, v.912, p.61–71, 2001.

CARVALHO JUNIOR, R.N. de. **Obtenção de extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) por extração supercrítica: determinação do rendimento global, de parâmetros cinéticos e de equilíbrio e outras variáveis do processo**. 151 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

CARSON, C.F.; MEE, B.J.; RILEY, T.V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.6, p.1914–1920, 2002.

CASTRO, M.D.L. de; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p.2383–2389, 2010.

CLAVIN, M.L.; GORZALCZANY, S.; MIÑO, J.; KADARIAN, C.; MARTINO, V.; FERRARO, G.; ACEVEDO, C. Antinociceptive Effect of some Argentine Medicinal Species of *Eupatorium*. **Phytotherapy research**, v.14, p. 275–277, 2000.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. 2011. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf2008_dcbio/_ebooks/regiao_sul/Regiao_Sul.pdf>. Acesso em: 10/06/2013.

CORSO, M. P.; FAGUNDES-KLEIN, M. R.; SILVA, E. A.; CARDOZO-FILHO, L.; SANTOS, J. N.; FREITAS, L. S.; DARIVA, C. Extraction of sesame seed (*Sesamunindicum* L.) oil using compressed propane and supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v.52, p.56-61, 2010.

CORTESI, A.; KIKIC, I.; ALESSI, P.; TURTOI, G.; GARNIER, S. Effect of chemical structure on the solubility of antioxidants in supercritical carbon dioxide: experimental data and correlation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 14, n. 2, p. 139-144, 1999.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DANH, L. T.; MAMMUCARI, R.; TRUONG, R.; FOSTER, N. Response surface method applied to supercritical carbon dioxide extraction of *Vetiveria zizanioides* essential oil. **Chemical Engineering Journal**, v.155, p.617-626, 2009.

DEBENEDETTI, P. G. & REID, R. C. Diffusion and mass transfer in supercritical fluids. **AIChE Journal**. v.32, n.12, p.2034-2046, 1986.

DIEHL, L.C.P. **Extração e fracionamento de compostos com princípios ativos de própolis usando o dióxido de carbono supercrítico**. 248 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A.H. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. Ed. UNESP, 2 ed., São Paulo, 2002.

DÍAZ-MAROTO, M.C.; PÉREZ-COELLO, M.S.; CABEZUDO, M.D. Supercritical carbon dioxide extraction of volatiles from spices: Comparison with simultaneous distillation–extraction. **Journal of Chromatography A**, v.947, p. 23–29, 2002.

DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMINGUÉZ, H.; PARAJO, J. C. Supercritical CO₂ Extraction and purification of Compounds with Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.2441-2469, 2006.

DJERIDANE, A.; YOUSFI, M.; NADJEMI, B.; BOUTASSOUNA, D.; STOCKER, P.; VIDAL, N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds, **Food Chemistry**, v. 97, p. 654–660, 2006.

DUETZ, W.A.; BOUWMEESTER, H.; VAN BEILEN, J.B.; WITHOLT, B. Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 269-277, 2003.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, **Ministério da Saúde – Agência Nacional da Vigilância Sanitária**. 5 Edição. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 1999.

FERREIRA, S.R.S.; MEIRELES, M.A.A.; CABRAL, F.A. Extraction of Essential Oil of Black Pepper with Liquid Carbon Dioxide. **Journal of Food Engineering**, v.20, p.121- 133, 1993.

FERREIRA, S.R.S.; NIKOLOV, Z.L.; DORAISWAMY, L.K.; MEIRELES, M.A.A.; PERENATE, A.J. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **Journal of Supercritical Fluids**, v.14, p.235–245, 1999.

FRANCO, B.D.G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

FREITAS L. S.; OLIVEIRA J. V.; DARIVA, C.; JACQUES R. A.; CARAMÃO, E. B. Extraction of grape seed oil using compressed carbon dioxide and propane: extraction yields and characterization of free glycerol compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.2558-2564, 2008.

FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **The journal of Biological Chemistry**, v. 73, p. 627-650, 1927.

FORNARI, T.; VICENTE, G.; VÁZQUEZ, E.; GARCÍA-RISCO, M.R.; REGLERO, G. Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. **Journal of Chromatography A**, v.1250, p. 34– 48, 2012.

GALVÃO, E.L. **Extração supercrítica de óleo de linhaça: construção do extrator, estudo de parâmetro de processo, avaliação química e antioxidante do produto**. 142 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de engenharia química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

GARMUS, T. T.; PAVIANI, L. C.; QUEIROGA, C. L.; MAGALHÃES, P. M.; CABRAL, F. A. Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. **Journal of Supercritical Fluids**, v.86, p.4-14, 2014.

GIRARD, E.A., **Volume, Biomassa e Rendimento de Óleos Essenciais do Craveiro (*Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum) em Floresta Ombrófila Mista**. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Departamento de pós-graduação em Ciências Florestais, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

GOMIDE, R. Operações com sistemas sólidos granulares, in: R. Gomide (Ed.), **Operações Unitárias**, vol. 1, Edição do autor, São Paulo, 1983.

GOÑI, P.; LÓPEZ, P.; SÁNCHEZ, C.; GÓMEZ-LUS, R.; BECERRIL, R.; NERÍN, C. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, v.116, p.982–989, 2009.

GRIGONIS, D.; VENSKUTONIS, P. R.; SIVIK, B.; SANDAHL, M.; ESKILSSON, C. S. Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloe odorata*). **The Journal of Supercritical Fluids**, v.33, p.223-233, 2005.

GROSSMAN, L.; VITUNE, G.; JANUÁRIO, S. **Óleos Essenciais na culinária, cosmética e saúde**, Editora Optionline, São Paulo, 2005.

HABTEMARIAN, S.; MACPHERSON, A.M. Cytotoxicity and antibacterial activity of ethanol extract from leaves of an herbal drug, boneset (*Eupatorium perfoliatum*). **Phytotherapy Research**, v.14, p. 575-577, 2000.

HAMDAN, S.; DAOOD, H.G.; TOTH-MARKUS, M.; ILLÉS, V. Extraction of cardamom oil by supercritical carbon dioxide and sub-critical propane. **Journal of Supercritical Fluids**, v.44, p. 25–30, 2008.

HAMMERSCHMIDT, P. A.; PRATT, D. E. Phenolic antioxidants of dried soybeans. **Journal of Food Science**, v.43, p.556-559, 1978.

HENG, G. P.; KENNEY, M.; LAM, L. K. T. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 999-1003, 1992.

HIERRO, M. T. G. **Temas Avanzados de Análisis Químicas**. Edinford S. A., Madrid, 1994.

HU, M.; SKIBSTED, L.H. Antioxidative capacity of rhizome extract and rhizome knot extract of edible lotus (*Nelumbo nuficera*). **Food Chemistry**, v.76, p.327–333, 2002.

HUANG, D., OU, B.; PRIOR, R.L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.53, p.1841-1856, 2005.

IBAÑEZ, E.; KUBÁTOVÁ, A.; SEÑORÁNS, F. J.; CAVERO, S.; REGLERO, G.; HAWTHOME, S. B. Subcritical Water Extraction of Antioxidant Compounds from *Rosemary* Plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.375-382, 2003.

IBGE. 1992. **Manual técnico da vegetação brasileira**. Disponível em: <http://www.labogef.iesa.ufg.br/labogef/arquivos/downloads/Manual_Tecnico_da_Vegetacao_Brasileira_n_48361.pdf>. Acesso em: 10/072013.

ILLÉS, V.; DAOOD, H. G.; PERNECZKI, S.; SZOKONYA, L.; Then, M. Extraction of coriander seed oil by CO₂ and propane at super and subcritical conditions. **Journal of Supercritical Fluids**, v.17, p.177-186, 2000.

ILLÉS, V.; SZALAI, O.; THEN, M.; DAOOD, H.; PERNECZKI, S. Extraction of hiprose fruit by supercritical CO₂ and propane. **Journal of Supercritical Fluids**, v.10, p.209-218, 1997.

KATINAS, L.; GUTIÉRREZ, D.G.; GROSSI, M.A.; CRISCI, J.V. Panorama de la familia Asteraceae (Compositae) en la Republica Argentina. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v.42, p. 113-129, 2007.

KITZBERGER, C.S.G.; SMÂNIA JR., A.; PEDROSA, R.C.; FERREIRA, S.R.S. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 631–638, 2007.

KOPCAK, U.; MOHAMED, R.S. Caffeine solubility in supercritical carbon dioxide/co-solvent mixtures. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.34, p. 209–214, 2005.

LANÇAS, F.M. 2000. **Fluidos Supercríticos**. Disponível em: <http://www.bioteecnologia.com.br/revista/bio16/16_fluidos.pdf>. Acesso em: 01/06/2013.

LAWRENCE, G. H. M. **Taxonomia das Plantas Vasculares**, volume I, Fundação Galouste Gulbenkian, Lisboa, 1951.

LEAL, P. F.; BRAGA, M. E. M.; SATO, D. N.; CARVALHO, J. E.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Functional properties os spice extracts obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2520-2525, 2003.

LINSTROM, P. J.; MALLARD, W.G. 2012. **National Institute of Standards and Technology**. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry/fluid>>. Acesso em: 17/06/2013.

LIS-BALCHIN, M.; DEANS, S. G. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.82, p.759-762, 1997.

LV, F.; LIANG, H.; YUAN, O.; LI, C. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. **Food Research International**, v.44, p.3057–3064, 2011.

LU, Y; FOO, Y. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). **Food Chemistry**, v.75, p.197–202, 2001.

MADSEN, H.L.; BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p.271-277, 1995.

MANNINEN, P.; PAKARINEN, J.; KALLIO, H. Large-Scale Supercritical Carbon Dioxide Extraction and Supercritical Carbon Dioxide Countercurrent Extraction of Cloudberry Seed Oil. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.45, p. 2533–2538, 1997.

MARTINÉZ, J. **Extração de Óleos Voláteis e Outros Compostos com CO₂ Supercrítico: Desenvolvimento de uma Metodologia de Aumento de Escala a partir da Modelagem Matemática do Processo e Avaliação dos Extratos Obtidos**. 172 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

MARTINEZ-CORREA, H.A.; MAGALHÃES, P.M.; QUEIROGA, C.L.; PEIXOTO, C.A.; OLIVEIRA, A.L.; CABRAL, F.A. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of Extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p. 998-1006, 2011.

MARTINS, S.; PADILHA, E.; OCETE, M.A.; GALVEZ, J.; JIMÉNEZ, J.; ZARZUELO, A. Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Bupleurum frutescens*. **Planta medica**, v. 59, p. 533-536, 1993.

MATTHÄUS, B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oil seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3444-3452, 2002.

McHUGH, M. & KRUKONIS, V. **Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice**. Boston, Butterworth Publishers, 1986.

MELECCHI, M.I.S. **Caracterização química de extratos de *Hibiscus tiliaceus* L: estudo comparativo de métodos de extração**. 197 f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MELO, A.S. **Avaliação neurocomportamental, antinociceptiva e antioxidante do extrato hidroalcoólico de *Eupatorium ayapana* Vent(asteraceae)**. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêutica) – Departamento de pós-graduação em Ciências Farmacêutica, Universidade Federal do Pará, Belém, 2012.

MENDES, S.; NUNES, D. S.; MARQUES, M. B.; TARDIVO, R. C.; CECHINEL FILHO, V.; SIMIONATTO, E. L.; WISNIEWSKI JUNIOR, A. Essential oil of *Baccharis semiserrata*, a source of spathulenol. **Ciências exatas e da terra, ciências agrárias e engenharias**, v. 14, p. 241-245, 2008.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO G. G.; REIS A. S.; SANTOS T. C.; COUBE C.S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. **Phytoterapy Research**. v.15, p.27-130, 2001.

MESOMO, M.C.; SCHEER, A. de P.; PEREZ, E.; NDIAYE, P.M.; CORAZZA, M.L. Ginger (*Zingiber officinale* R.) extracts obtained using supercritical CO₂ and compressed propane: Kinetics and antioxidant activity evaluation. **Journal of Supercritical Fluids**, v.71, p.102– 109, 2012.

MESOMO, M.C. **Obtenção de extrato de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) usando CO₂ supercrítico e propano comprimido: cinética de extração e atividade biológica**. 79 f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Pós-

graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

MESOMO, M.C.; CORAZZA, M.L.; NADIAYE, P.M.; DALLA SANTA, O.R.; CARDOZO, L.; SCHEER, A.P. Supercritical CO₂ extracts and essential oil of ginger (*Zingiber officinale* R.): Chemical composition and antibacterial activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 80, p. 44-49, 2013.

MICHIELIN, E.M.Z. **Avaliação do processo de extração com fluido supercrítico da oleoresina de cavalinha (*Equisetum arvense*)**. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

MICHIELIN, E.M.Z.; BRESCIANI, L.F.V.; DANIELSKI, L.; YUNES, R.A.; FERREIRA, S.R.S. Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v.33, p.131-138, 2005.

MICHIELIN, E.M.Z. **Obtenção de extrato de erva baleeira (*Cordia verbenacea* d.c.) por diferentes técnicas: medida da atividade biológica, modelagem matemática e determinação do equilíbrio de fases**. 235 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

MICHIELIN, E.M.Z.; SALVADOR, A.A.; RIEHL, C.A.S.; SMÂNIA Jr, A.; SMÂNIA, E.F.A.; FERREIRA, S.R.S. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresource Technology**, v.100, p.6615–6623, 2009.

MICHIELIN, E.M.Z.; WIESE, L.P. de L.; FERREIRA, E.A.; PEDROSA, R.C.; FERREIRA, S.R.S. Radical-scavenging activity of extracts from *Cordia verbenacea* DC obtained by different methods. **Journal of Supercritical Fluids**, v.56, p. 89–96, 2011.

MIGUEL, L.M. 2009. **Experiências sobre a Utilização da Biodiversidade: as bioindústrias de cosméticos na Amazônia brasileira** Disponível em: <http://egal2009.easyplanners.info/area06/6181_Mourao_Miguel_Lais.pdf>. Acesso em: 04/06/2013.

MISHARINA, T. A.; TERENINA, M. B.; KRIKUNOVA, N. I. Antioxidant Properties of Essential Oils. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.45, n.6, p.642–647, 2009.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.R.; van BEEK, T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v.85, p.231–237, 2004.

MONTAÑES, F.; FORNARI, T.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J.; MONTILLA, A.; CORZO, N.; OLANO, A.; IBÁÑEZ, E. Selective fractionation of disaccharide mixtures by

supercritical CO₂ with ethanol as co-solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v.41, p.61–67, 2007.

NASCIMENTO, M. do S.B.; OLIVEIRA, M.E. 2005. **Diversidade e uso de plantas nativas**. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2005/artigo.2005-12-05.8820647706>>. Acesso em: 04/06/2013.

NIKAIDO, H.; VAARA, M. Molecular Basis of Outer Membrane Permeability. **Microbiological Reviews**, v. 49, p. 1-32, 1985.

NISSEN, L.; ZATTA, A.; STEFANINI, I.; GRANDI, S.; SGORBATI, B.; BIAVATI, B.; MONTI, A. Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). **Fitoterapia**, v. 81, p. 413–419, 2010.

OLIVEIRA, D.A. de. **Caracterização fitoquímica e biológica de extratos obtidos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) das variedades merlot e syrah**. 211 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

PAULUCH, M.; CASAGRANDE, M.M.; MIELKE, O.H.H. Estágios imaturos de *Actinote surima* (Schaus) (Lepidoptera, Nymphalidae, Acraeinae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.16, n.2, p. 129-140, 1999.

PIO-CORRÊA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1984.

PRICE, M.L.; BUTLER, L.G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, n.6, p.1268-1273, 1977.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v.269, p.337-341, 1999.

RASHID, S.; RATHER, M.A.; SHAHB, W.A.; BHAT, B.A. Chemical composition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia indica* Willd. **Food Chemistry**, v. 138, p. 693–700, 2013.

REVERCHON, E.; SENATORE, F. Isolation of rosemary oil: comparison between hydrodistillation and supercritical CO₂ extraction. **Flavour and Fragrance Journal**, v.7, p. 227-230, 1992.

REVERCHON, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. **Journal of Supercritical Fluids**, v.10, p. 1-37, 1997.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**, v.38, p.146–166, 2006.

RIBAS, M.C. **Estudo do processo combinado de extração em altas pressões e purificação do óleo de candeia pelo processo de adsorção em coluna de leito fixo**. 111 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2012.

RIBEIRO, E.T.S. **Emprego de técnicas de extração a alta e baixa pressão para obtenção de polifenóis antioxidantes do subproduto agroindustrial de maçã**. 118 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

RICE-EVANS, C., MILLER, N.J., PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in plant science**, 2 (4), 152-159, 1997.

ROGINSKY, Y. V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v.92, p.235-254, 2005.

ROLIM, R.G. ***Eupatorium intermedium* DC**. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=4855>. Acesso em: 14/06/2013.

ROTA, M. C.; HERRERA, A.; MARTINEZ, R. M.; SOTOMAYOR, J. A.; JORDAN, M. J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control**, v.19, p.681–687, 2008.

RUSSO, E. B. Review: Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects . **British Journal of Pharmacology**, v. 163, p. 1344–1364, 2011.

SALEHI P.; SONBOLI, A.; EFTEKHAR, F.; NEJAD-EBRAHIMI, S.; YOUSEFZADI, M. Essential Oil Composition, Antibacterial and Antioxidant Activity of the Oil and Various Extracts of *Ziziphora clinopodioides* subsp. *rigida* (BOISS.) RECH. f. from Iran. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n.10, p.1892-1896, 2005.

SALUNKHE, O.K.; CHAVAN, J.K.; KADAM, S.S. Dietary Tannins: Consequences and Remedies, **CRC Press**, Boca Raton, FL, 1989.

SANTOS, D.N. **Extração com dióxido de carbono supercrítico e estudo da composição dos extratos de sementes de Pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SCHNEIDER, A.A. ***Eupatorium intermedium* DC**. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=9329>. Acesso em: 14/06/2013.

SCHOONEN, J.W.; SALES, M.G.F. Determination of polyphenols in wines by reaction with 4-aminoantipyrine and photometric flow-injection analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 372, p.822-828, 2002.

SCHWALBE, R.; STEELE-MOORE, L.; GOODWIN, A.C. **Antimicrobial susceptibility testing protocols**. Boca Raton: CRC Press, 2007.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.32, n.1, p.67- 103, 1992.

SHARMA, O.P.; DAWRA, R.K.; KURADE, N.P.; SHARMA, P.D. A review of the toxicosis and biological properties of the genus *Eupatorium*. **Natural Toxins**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 1998.

SIANI, A. C.; SAMPAIO, A.L.F.; SOUSA, M.C. de; HENRIQUES, M. das G. M. O.; RAMOS, M.F. de S. Óleos essenciais: potencial anti-inflamatório. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 3, n. 16, p.38-43, 2000.

SILVA, D.C. de M.N. da. **Determinação experimental de parâmetros de processo na extração supercrítica de óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera* less)**. 130f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

SILVA, D.C. de M.N. da. **Extração supercrítica de plantas aromáticas e medicinais (lavanda brasileira (*Aloysia gratissima*), quebra pedra (*Phyllanthus amarus*) e ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculata*)): dados experimentais, composição e avaliação da atividade biológica** 213f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

SILVA, D.C.M.N.; BRESCIANI, L.F.V.; DALAGNOL, R.L.; DANIELSKI, L.; YUNES, R.A.; FERREIRA, S.R.S. Supercritical fluid extraction of carqueja (*Baccharis trimera*) oil: Process parameters and composition profiles. **Food and Bioprocess Processing**, v.87, p.317-326, 2009

SILVA, F. A. M.; BORGES, F.; GUIMARÃES, C.; LIMA, J. L. F. C.; MATOS, C.; REIS, S. Phenolic Acids and Derivatives: Studies on the Relationship among Structure, Radical Scavenging Activity, and Physicochemical Parameters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.2122-2126, 2000.

SILVA, A. C.R. da; LOPES, P.M.; AZEVEDO, M.M.B. de; COSTA, D.C.M.; ALVIANO, C.S.; ALVIANO, D.S. Biological Activities of α -Pinene and β -Pinene Enantiomers. **Molecules**, v. 17, p. 6305-6316, 2012.

SIMÕES, C. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Ed. Universidade-UFRRGS e Ed. Da UFSC. Porto Alegre e Florianópolis, p. 821, 1999.

SINGLETON, V.L.; ROSSI JR, J.A. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p. 144-158, 1965.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v.299, p.152-178, 1999.

SMITH, R.M. Supercritical fluids in separation science – the dreams, the reality and the future. **Journal of Chromatography A**, v.856, p.83–115, 1999.

SOBRAL, M., PROENÇA, C., SOUZA, M., MAZINE, F., LUCAS, E. 2010. **Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/>>. Acesso em: 20/03/2013.

SOUZA, T.J.T. de. **Determinação da composição química e avaliação preliminar das atividade antioxidante e anticolinesterásica do óleos voláteis de espécies de Eupatorium L. (Asteraceae)**. 372 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SOUZA, C.M.M.; SILVA, H.R.S.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.C.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D; ARAÚJO, P.M.A.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, p.351-355, 2007.

SOUZA, T.J.T.; APEL, M.A.; BORDIGNON, S.; MATZENBACKER, N.I.; ZUANAZZI, J.A.S.; HEMRIQUES, A. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, n.3, p.368-372, 2007.

SOUZA, A.T.; BENAZZI, T.L.; GRINGS, M.B.; CABRAL, V.; SILVA, E.A.; CARDOZO-FILHO, L.; ANTUNES, O.A.C. Supercritical extraction process and phase equilibrium of Candeia (*Eremanthus erithropappus*) oil using supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v.47, p.182-187, 2008.

SPARKS, D.; HERNANDEZ, R.; ZAPPI, M.; BLACKWELL, D. ; FLEMING, T. Extraction of rice bran oil using supercritical carbon dioxide and propane. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.83, p.885-891, 2006.

SPITELLER, G. Peroxidation of linoleic acid and its relation to aging and age dependent diseases. **Mechanisms of ageing and development**, v.122, p.617-657, 2001.

STEFFANI, E. **Modelagem Matemática do Processo de Extração Supercrítica de Óleo Essencial de Ho-Sho (Cinnamomum camphora Nees & Eberm var. linaloolifera Fujita) Utilizando CO₂**. 92 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

STRATIL, P., KLEJDUS, B., KUBÁŇ, V. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables-evaluation of

spectrophotometric methods. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.54, p.607-616, 2006.

STRATIL, P., KLEJDUS, B., KUBÁŇ, V. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. **Talanta**, v.71, p.1741-1751, 2007.

STUMPF, E.R.T.; ROMANO, C.M.; BARBIERI, R.L. 2008. **Plantas nativas do Pampa: uma beleza a ser descoberta**. Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br/imprensa/artigos/2008/artigoLia_nativas.pdf> Acesso em 04/06/2013.

SUHR, Y-J. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, 1091-1097, 2002.

SUN, J. D-limonene: safety and clinical applications. **Alternative Medicine Review**, v.12, p. 259-264, 2007.

THOMAS, A.F.; BESSIÈRE, Y. (). Limonene. **Natural Product Reports**, v. 6, p. 291-309, 1989.

TRACY, N.I.; CHEN, D.C.; CRUNKLETON, D.W.; PRICE, G.L. Hydrogenated monoterpenes as diesel fuel additives. **Fuel**, v. 88, p. 2238-2240, 2009.

ULUBELEN, A.; TOPCU, G.; ERIS, C.; SONMEZ, U.; KARTAL, M.; KURUCU, S.; BOZOK-JOHANSSON, C. Terpenoids from *Salvia sclarea*. **Pytochemistry**, v. 36, p. 971-974, 1994.

VAARA, M. Agents That Increase the Permeability of the Outer Membrane. **Microbiological Reviews**, v. 56, p. 395-411, 1992.

VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. C.; O Gênero Capaifera L. **Química Nova**, v. 25, p. 273-286, 2002.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. **Óleo essencial de Eucalipto**. Disponível em: <<http://www.ipef.br/publicacoes/docflorestais/df17.pdf>>. Acesso em: 10/09/2012.

WAGNER, K.H.; ELMADFA, I. Biological relevance of terpenoids – overview focusing on mono-, di- and tetraterpenes. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 47, p. 95–106, 2003.

WENNERSTEN, R. Extraction of organic compounds. Chap 9. In: In: RYDBERG, J.; MUSIKAS, C.; CHOPPIN, G. R. **Principles and practices of solvent extraction**. New York: Marcel Dekker, p. 115-356, 1992.

WILLIAMS, DAVID G. **The chemistry of essential oils**. England: Micelle, 334p, 1996.

YADEGARINIA, D.; GACHKAR, I.; REZAEI, M.B.; TAGHIZADEH, M.; ASTANEH, S.A.; RASOOLI, I. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. **Phytochemistry**, v.67, p.1249–1255, 2006.

YAN, G.; JI, L.; LUO, Y.; HU, Y. Antioxidant Activities of Extracts and Fractions from *Eupatorium lindleyanum* DC. **Molecules**, v.16, p. 5998-6009, 2011.

ZARENA, A.S.; SACHINDRA, N.W.; SANKAR, U. Optimisation of ethanol modified supercritical carbon dioxide on the extract yield and antioxidant activity from *Garcinia mangostana* L. **Food Chemistry**, v.130, p.203–208, 2012.